日 本 国 特 許 庁 13.08.2004 JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 Date of Application:

2004年 3月24日

REC'D 07 OCT 2004

WIPO

PCT

出 願 番 号 Application Number:

人

特願2004-086129

[ST. 10/C]:

[JP2004-086129]

出 願
Applicant(s):

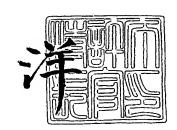
タカラバイオ株式会社

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

特許庁長官 Commissioner, Japan Patent Office 2004年 9月24日





【曹類名】 特許願 【整理番号】 T-1882

【提出日】平成16年 3月24日【あて先】特許庁長官殿【国際特許分類】C12N 15/00
C12N 9/22

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 【氏名】 友野 潤

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 【氏名】 上野 はるみ

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】302019245【氏名又は名称】タカラバイオ株式会社【代表者】加藤郁之進

【代表者】 【手数料の表示】

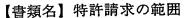
【予納台帳番号】 173212 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

 【物件名】
 明細書 1

 【物件名】
 要約書 1



【請求項1】

d s R N A 分解活性を有するタンパク質であって、 d s R N A に作用して特定の長さの d s R N A を生成する活性を有することを特徴とする d s R N A 分解活性を有するタンパク質。

【請求項2】

dsRNA分解活性を有するタンパク質が、Dicerの機能ドメインを有することを特徴とする請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】

Dicerの機能ドメインが、RNaseIIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなることを特徴とする請求項2記載のタンパク質。

【請求項4】

さらにPAZドメインを含むことを特徴とする請求項3記載のタンパク質。

【請求項5】

特定の長さのdsRNAが、約15~30塩基対のdsRNAであることを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項6】

dsRNA分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列、あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項1~5のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項7】

dsRNA分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項1~5のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項8】

請求項1~7のいずれか1項に記載のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造する方法であって、コドンを宿主での発現に適したものに変換するか、あるいはレアコドンに対する補強がなされた宿主を使用することを特徴とするdsRNA分解活性を有するタンパク質の製造方法。

【請求項9】

請求項1~7のいずれか1項に記載のdsRNA分解活性を有するタンパク質の製造方法であって、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることを特徴とするdsRNA分解活性を有するタンパク質の製造方法。

【請求項10】

請求項1~7のいずれか1項に記載のdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有するキット。

【請求項11】

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でdsRNAにdsRNA分解活性を有するタンパク質を作用させ、特定の長さのdsRNAを生成することを特徴とするdsRNAの分解方法。

【請求項12】

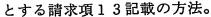
核酸結合活性を有するタンパク質と d s R N A 分解活性を有するタンパク質が融合タンパク質であることを特徴とする請求項 1 1 記載の方法。

【請求項13】

核酸結合活性を有するタンパク質が、RNA結合活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項11又は12に記載の方法。

【請求項14】

RNA結合活性を有するタンパク質がコールド ショック プロテインであることを特徴



【請求項15】

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴と する請求項14記載の方法。

【請求項16】

コールド ショック プロテインがサーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテインBであることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項17】

特定の長さのdsRNAが、約15~30塩基対のdsRNAであることを特徴とする請 求項11~16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

dsRNA分解活性を有するタンパク質が、請求項1~7のいずれか1項に記載のタンパ ク質であることを特徴とする請求項11~17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

d s R N A 分解活性を有するタンパク質が、天然型 D i c e r あるいはその機能的同等物 であることを特徴とする請求項11~17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でRNA合成活性を有するタンパク質を用いて RNA合成反応を行うことを特徴とするRNAの合成方法。

【請求項21】

核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク 質を用いることを特徴とする請求項20記載の方法。

【請求項22】

核酸結合活性を有するタンパク質が、コールド ショック プロテインであることを特徴 とする請求項20又は21記載の方法。

【請求項23】

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴と する請求項22記載の方法。

【請求項24】

コールド ショック プロテインが、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテインBであることを特徴とする請求項23記載の方法。

RNA合成活性を有するタンパク質が、DNA依存性RNAポリメラーゼであることを特 徴とする請求項20~24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

請求項11~19のいずれか1項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合 活性を有するタンパク質並びに d s R N A 分解活性を有するタンパク質を含有することを 特徴とする組成物。

【請求項27】

請求項11~19のいずれか1項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合 活性を有するタンパク質と d s R N A 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴 とするキット。

【請求項28】

請求項20~25のいずれか1項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合 活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とす る組成物。

【請求項29】

請求項20~25のいずれか1項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合 活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とす るキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】 dsRNA分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質を用いたdsRNA分解方法ならびにRNA合成方法

【技術分野】

[0001]

本発明は、特定の長さのdsRNAを生成する活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質、当該タンパク質と核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質を組み合わせたdsRNAの効率的な分解方法並びに核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を組み合わせたRNAの効率的な合成方法に関する。

【背景技術】

[0002]

最近、低分子dsRNAを利用する遺伝子工学的手法が報告されている。

例えば、RNA干渉(RNAi:RNA interference)は、dsRNAによってその配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子発現が抑制される現象である。dsRNAによって遺伝子サイレンシングができることがわかった発端は、線虫におけるアンチセンスを用いた研究からであった。1995年、GuoとKemphuesはpar-1と呼ばれる遺伝子をアンチセンスRNAで抑制する実験を行なった。アンチセンスRNAを加えると、予想通りpar-1の発現を抑制したが、驚いたことに、コントロールとして用いたセンスRNAも同様にpar-1の発現を抑制し、par-1変異株の表現形を示した。(例えば、非特許文献1)

この矛盾は、1998年にFireらによって解き明かされた。アンチセンスRNAとセンスRNAを、それぞれRNAポリメラーゼを用いて合成するとき、わずかに非特異的に逆向きのRNAができてしまう。そのコンタミネーションよってできるdsRNAが遺伝子サイレンシングの本体であり、アンチセンスRNAおよびセンスRNAは遺伝子の発現を抑制できないこと、またアンチセンスRNAとセンスRNAをアニールさせたdsRNAが効率よく遺伝子の発現を抑制できることが明らかとなった。(例えば、非特許文献2)

[0003]

上記RNA干渉においては、Dicerと呼ばれる酵素がdsRNAから小分子のRNA (siRNA: short interfering RNA) を生成させる。 (例えば、非特許文献3)

この酵素の作用により生じたsiRNAは、RISC(RNA induced silencing complex)と呼ばれる複合体に取り込まれ、該複合体が標的mRNAを認識し、分解すると考えられている。しかしながら、RNA干渉に関与すると考えられる各因子についての正確な機能についてはまだまだ未知の部分が多いのが現状であった。(例えば、非特許文献4)

[0004]

上記RNA干渉を効率よく行うためには、dsRNAならびにsiRNAを効率よく生成させることが重要である。上記Dicerとしてはヒト由来Dicer (例えば、非特許文献5)が例示され、さらにリコンピナントDicer (例えば、非特許文献6)がジーンセラピーシステムズ社あるいはストラタジーン社より販売されている。

しかしながら、上記のようなリコンビナントDicerについては、本来の酵素学的な性能を十分に発揮しているかどうかについては詳細に検討されていない。また、上記Dicerの少なくともどのドメインを含有すれば、dsRNAに作用させて好適なdsRNA(siRNA)を生成させる活性を保持することができるか、さらにその遺伝子工学的な生産性を向上できるかについては知られていない。

さらに、dsRNAを効率よく生成させる方法についても特に有効な方法は知られていないのが現状であった。

[0005]

さらに、RNAポリメラーゼを用いて合成した約21ヌクレオチドの鎖長のdsRNA をそのままsiRNAとして利用する方法も報告されている(例えば、非特許文献7)。 従って、RNAが効率よくできる方法があれば上記方法にも利用できる。

[0006]

【非特許文献1】Guo S. 他1名 Cell 1995年 vol. 81、p6 11-620

【非特許文献 2】 Fire A. 他 5名 Nature 1998年 vol. 39、p806-811

【非特許文献3】Bernstein E. 他3名 Nature 2001年 vol. 409、p363-366

【非特許文献4】Tabara H. 他3名 Cell 2002年 vol. 10 9、p861-871

【非特許文献 5】 Zhang H. 他 4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p5875-5885

【非特許文献 6】 Myers J. W. 他3名 Nature biotechnology 2003年 vol. 21、p324-328

【非特許文献7】Donze O. 他1名 Nucleic Acids Research 2002年 vol. 30, No. 10, e46

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

[0007]

本発明の課題は、特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質の提供、RNA干渉等に利用可能な特定の長さのdsRNAを効率よく生成させる方法並びにRNA合成の促進方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

[0008]

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討した結果、Dicerの機能ドメインを解析し、長鎖のdsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質を見出した。また、核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質の共存下でdsRNAにdsRNA分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さのdsRNAを効率よく調製できること、さらに当該核酸結合活性を有するタンパク質がdsRNA合成に代表されるRNA合成反応においてもその効率を向上させることを見出し、本発明を完成させた。

[0009]

すなわち、本発明の第1の発明は、dsRNA分解活性を有するタンパク質であって、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成する活性を有することを特徴とするdsRNA分解活性を有するタンパク質に関する。

本発明の第1の発明において、dsRNA分解活性を有するタンパク質は、Dicerの機能ドメインを有することが好ましく、例えば、RNaseIIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるものが好ましい。さらに、PAZドメインを含んでいても良い。また、本発明の第1の発明のタンパク質を用いることにより、特定の長さのdsRNAが約15~30塩基対のdsRNAを生成させることができる。また本発明の第1の発明のタンパク質としては、dsRNA分解活性を有するタンパク質が配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質が例示される。あるいは、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。また、本発明の第1の発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、コドンを宿主での発現に適したものに変換することによって、あるいはレアコドンに対する補強がなされた宿主を使用する

ことによって効率よく製造することができる。

また、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることができる。さらに本発明の第1の発明のタンパク質は、コンポーネントとしてキットに含有させることができる。

[0010]

本発明の第2の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でdsRNAにdsRNA分解活性を有するタンパク質を作用させ、特定の長さのdsRNAを生成することを特徴とするdsRNAの分解方法に関する。

本発明の第2の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質と d s R N A 分解活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、核酸結合活性を有するタンパク質は、R N A 結合活性を有するタンパク質であっても良い。当該 R N A 結合活性を有するタンパク質は、コールド ショック プロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテインBが例示される。

本発明の第2の発明の方法により、特定の長さのdsRNAが、約15~30塩基対のdsRNAを生成することができる。さらに、本発明の第2の発明において、dsRNA分解活性を有するタンパク質は、本発明の第1の発明のタンパク質であっても良いし、天然型Dicerあるいはその機能的同等物であっても良い。

[0011]

本発明の第3の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でRNA合成活性を有するタンパク質を用いてRNA合成反応を行うことを特徴とするRNAの合成方法に関する。

本発明の第3の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、当該核酸結合活性を有するタンパク質は、コールド ショック プロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテインBが例示される。さらに、RNA合成活性を有するタンパク質はDNA依存性RNAポリメラーゼであってもよい。

[0012]

本発明の第4の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質並びにdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

[0013]

本発明の第5の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質とdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキットに関する。

[0014]

本発明の第6の発明は、本発明の第3の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

[0015]

本発明の第7の発明は、本発明の第3の方法に用いるためのキットであって、核酸結合 活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とす るキットに関する。

【発明の効果】

[0016]

本発明により、特定の長さのdsRNAを調製できるdsRNA分解活性を有するタンパク質が提供される。さらに本発明により、RNA干渉等に利用できる特定の長さのdsRNAを効率よく生成させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

[0017]

本明細書においてDicerとは、RNAiの初期段階で長鎖のdsRNAをsiRNAにプロセッシングできる機能を有するタンパク質のことを言う。天然型のDicerとしては、とくに限定はされないが例えばN末端側よりATP結合ドメイン、RNAへリカーゼドメイン、機能未知なPAZドメイン、RNaseIIIa及びbドメイン、さらにdsRNA結合ドメインから構成されているものが挙げられる。

[0018]

本明細書において、Dicerの機能ドメインとは、長鎖dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成できる活性に関与する領域をコードする部位のことを言う。

[0019]

上記機能ドメインとしては、特に限定はされないが例えば、RNaseIIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインからなるものが例示される。当該RNaseIIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインからなるものが例示される。当該RNaseIIIa、bドメインは、Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p5875-5885に記載のように、2本鎖RNAに特異的に作用し、5、末端にリン酸基をもつを特定の鎖長のオリゴヌクレオチドを生成させる活性に関与する領域をコードする部位であっても良い。さらに、dsRNA結合ドメインは、2本鎖RNAに特異的に結合する活性をコードする部位であっても良い。

[0020]

本明細書においてdsRNAとは、RNA干渉の対象となるmRNAと該mRNAに相補的な塩基配列を有するRNAとの2本鎖構造を形成したRNAのことを言う。

また、本明細書においてdsRNAの分解反応による生成物の応用例としては、主に以下に示すsiRNAがある。

[0021]

本明細書において特定の長さのd s R N A とは、特に限定はされないが例えば、約 10 ~ 100 塩基対の範囲中の特定の長さのd s R N A のことを言う。さらに、約 15 ~ 30 塩基対の範囲中の特定の長さ、特に 20 ~ 25 塩基対の範囲中の特定の長さのd s R N A であっても良い。これらのd s R N A は、s i R N A として使用できる。

[0022]

本明細書において核酸結合活性を有するタンパク質とは、一本鎖または二本鎖のDNA、RNAに結合する活性を有するタンパク質のことを言う。当該タンパク質としては、核酸の二次構造を解消する機能を有するものが好ましく、例えば、DNAへリカーゼ、RNAへリカーゼあるいはその機能的同等物が挙げられる。

[0023]

本明細書において低温誘導性ベクターとは、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターのことを言い、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCo1d系ベクターが挙げられる。

[0024]

本明細書においてコールド ショック プロテインとは、本来の生育条件よりも低温になるような状況下でその温度低下により刺激されて発現されるタンパク質の総称を言う。

[0025]

本明細書において基質となる長鎖のdsRNAを完全に分解するとは、分解反応後に未切断の基質となる長鎖のdsRNAが電気泳動法において確認されない程度に分解することを言う。

[0026]

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明の d s R N A 分解活性を有するタンパク質、該タンパク質の製造方法ならび に該タンパク質を含有するキット

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成することができる。当該dsRNA分解活性を有するタンパク質としては、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば特に限定

はなく、例えば、Dicerの機能ドメインを有するタンパク質が例示される。当該Dicerの機能ドメインは、RNaseIIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるタンパク質であっても良い。また、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば、そのタンパク質の由来は問わない。

当該RNaseIIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインは、特に限定はされないが例えばヒト由来Dicerの場合、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列のN末端側のアミノ酸1271~1924(配列表の配列番号2記載の塩基配列番号3811~5772)を有するものが挙げられる。例えば、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号3記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質(Dicer変異体)あるいは配列表の配列番号12記載のアミノ酸配列からなるタンパク質(Dicer変異体)が例示される。

また、Dicerはサイズの大きいタンパク質であり、組換え体を製造するのに適していない。一方、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、ネイティブな酵素に比べてサイズが小さくコンパクトであり、組換え体を製造するのに有用である。一般に、ヒトなどの高等生物由来の酵素を組換え体として大腸菌などのバクテリア細胞で製造する場合、同等の酵素活性を保持したまま組換え体を製造することは困難を伴うことが多い。従って、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、その由来となる生物以外の細胞で製造する際に非常に有用である。

[0027]

さらに本発明のタンパク質においては、PAZドメインを含有していても良く、特に限定はされないが例えば、配列表の配列番号17記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質 (Dicer変異体) あるいは配列表の配列番号18記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号19記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質 (Dicer変異体) が例示される。

[0028]

さらに、変異体により、さらに酵素的に安定なものにすることが可能である。特に限定はされないが、例えば、PAZドメイン+RNaseIIIドメインの場合、RNaseIIIドメインのみの変異体タンパク質に比べて安定性を向上させることができる。より多くの凍結、融解を施した場合でも活性を保持でき、またある保存緩衝液中では溶液状態でより長期間の活性保持が可能である。

[0029]

本発明のタンパク質は、特に限定はされないが例えば、長鎖 d s R N A を分解し、R N A 干渉に有効な s i R N A を生成させることができる。

また、上記機能を有する範囲であれば上記アミノ酸配列あるいは塩基配列において、一ないしは複数個のアミノ酸あるいは塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加されたものも本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質に含まれる。

特に限定はされないが、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列(例えば、Perfect DB配列等)、発現タンパク質精製用のタグ配列(例えば、His tag配列等)、あるいは発現タンパク質のN末端側の付加配列を除去するための配列(例えば、Factor Xa配列等)などのアミノ酸配列を付加したものも本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質に含まれる。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12又は18記載のアミノ酸配列を有するdsRNA分解活性を有するタンパク質が挙げられる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、長鎖のdsRNAを特定の長さのdsRNAにすることができる。すなわち、本発明においては使用するdsRNA分解活性を有するタンパク質を選択することにより、所望の特定の長さのdsRNAを調製することができる。当該特定の長さのdsRNAは、特に限定はされないが例えば、約10~



100 塩基対の範囲、好ましくは約 $15\sim30$ 塩基対の範囲、特に好ましくは約 $20\sim2$ 5 塩基対の範囲中の特定の長さの dsRNAが例示される。

また、従来市販されている酵素によって、基質として用いたdsRNAは完全に分解されないのに対し、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、基質となる長鎖のdsRNAを実質的に全て切断することができる。従って、基質のdsRNAを全て切断することができ、なおかつその分解産物によるRNA干渉作用が同等であるので、基質となる長鎖のdsRNAのスケールダウン、ひいては未分解のdsRNA除去工程の省略も可能となる。

さらに、本発明のd s R N A 分解活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えばDicer変異体は、p H 8. 5以上のトリスー塩酸緩衝液中で塩化マグネシウムの存在下で保存することにより、4℃保存ならびに−20℃保存のいずれの場合においてもその活性を長期間安定に保持することができる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、下記(2)に記載の核酸結合活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態であっても良い。特に限定はされないが、上記Dicer変異体と核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質が例示される。

[0030]

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造するための方法としては、コドンを宿主での発現に適したものに変換するか、あるいはレアコドンに対する補強することを含む方法であっても良い。特に限定はされないが例えば、発現遺伝子のコドン改変を含む製造方法であってもよく、当該タンパク質のアミノ酸配列の一部又は全てをタンパク発現の至適のコドン状態に変換したもの、もしくはそれに準じる状態の宿主を用いて発現させることができる。前記至適のコドン状態、もしくはそれに準じる状態の宿主としては、特に限定はされないが例えば、特定のコドンを認識するtRNA量を遺伝子工学的に通常この細胞中で産生する量よりも数倍以上高めた宿主が例示される。当該宿主としては、大腸菌が例示され、例えばアルギニンのコドン(AGA、AGG)のtRNAを補充した大腸菌が分に入り、プロリン(CCC)、ロイシン(CUA)のtRNAを補充した大腸菌等が挙げられる。

さらに、コドン改変を行って、宿主中での目的のタンパク質の発現を向上させる方法を 用いても良く、その際にmRNAの2次構造を考慮にいれても良い。

すなわち、発現遺伝子のコドン変換、補強等によりタンパク発現が向上するような方法 であれば特に限定はされない。

[0031]

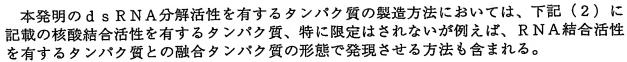
本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造するためのベクターには、特に限定はなく、市販のベクター、発現系のいずれもが使用できる。特に、限定はされないが例えばpETシステム(ノバジェン社製)を用いることができる。さらに、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターが好適に使用でき、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターが挙げられる。

本発明の製造方法の一態様としては、上記Dicer変異体を低温で機能し得るプロモーターを有するベクター、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターで製造する方法が例示される。

すなわち、本発明の製造方法においては、特定の長さのdsRNAを生成させ得る機能を保持できるタンパク質を発現できるベクターであればいずれもが好適に使用できる。

また、当該特定の長さの d s R N A を生成させ得る機能を最終的に保持できるタンパク質を得られるならば、タンパク発現時は封入体の形態であるがその後のリホールディング操作により当該機能を回復できるものを発現できるベクターも含まれる。

本発明の方法の一態様、例えば上記Dicer変異体を製造する場合においては、従来のヒト由来Dicerの全長を発現させた場合に比較して、生産量が向上し、さらに当該タンパク質の活性保持体の取得率も向上させることができる。



[0032]

(2) 本発明の核酸結合活性を有するタンパク質による d s R N A の分解の促進方法並びに当該タンパク質を用いた R N A 合成促進方法

本発明の特定の長さのdsRNAを生成することを特徴とするdsRNA分解の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパクとしては、結果的にdsRNA分解活性を促進するものであれば特に限定はなく、例えば、上記RNA結合活性を有するタンパク質等が好適に使用できる。

当該RNA結合活性を有するタンパク質としては特に限定はないが、コールド ショック プロテイン(Csp:coldshockprotein)が例示される。特に 常温域で機能し得るコールドショックプロテインが好適に使用でき、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールドショックプロテインが好ましい。特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号 9記載のアミノ酸配列(配列表の配列番号 10記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列)を有するサーモトガ マリティマ(10 中 10 中

当該CspBタンパク質をdsRNA分解活性を有するタンパク質と組み合わせることにより、当該dsRNA分解活性を促進させることができる。さらに本発明の方法は、上記(1)記載の特定の長さのdsRNAを生成させるdsRNA分解活性を有するタンパク質、例えばDicer変異体、天然型Dicerあるいは市販のリコンビナントDicer0ような機能的同等物のいずれにおいてもその特定の長さのdsRNAを生成させる活性を促進できる。

本発明の方法において、核酸結合活性を有するタンパク質とdsRNA分解活性を有するタンパク質を組み合わせることにより、当該dsRNA分解活性を促進させることができ、得られる分解産物は核酸結合活性を有するタンパク質を組合わせなかった場合の分解産物と比べて、RNA干渉作用において単位重量あたり同等の活性を有する。従って、核酸結合活性を有するタンパク質を使用することは、RNA干渉において非常に有用である

また、従来行われている方法では、基質として用いた d s R N A は完全に分解されないのに対し、本発明の方法において、基質となる長鎖の d s R N A を実質的に全て切断することができる。従って、基質の d s R N A を全て切断することができ、なおかつその分解産物による R N A 干渉作用が同等であれば、基質となる長鎖の d s R N A のスケールダウン、ひいては未分解の d s R N A 除去工程の省略も可能となる。

さらに、本発明の方法においては、当該核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA合成活性を有するタンパク質は、dsRNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態のものであってもよい。

[0033]

一方、本発明のRNA合成の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパクとしては、結果的にRNA合成活性を有するタンパク質のRNA合成活性を促進するものであれば特に限定はなく、核酸結合活性を有するタンパク質、コールドショックプロテイン(Csp:cold shock protein)が好適に使用できる。当該コールド ショック プロテインは、特に限定は

されないが好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のものが好適に使用できる。当該コールドショックプロテインとしては特に限定はされないが、配列表の配列番号 9 記載のアミノ酸配列(配列表の配列番号 1 0 記載の塩基配列)を有するサーモトガ マリティマ (Thermotoga maritima)由来のCspBタンパク質が例示される。

当該CspBタンパク質をRNA合成系に共存させることにより、例えばRNA ポリメラーゼのRNA合成活性を促進させることができる。当該タンパク質は、生成物が一本鎖あるいは二本鎖RNAのいずれの場合においても、その合成活性を促進することができる。

[0034]

さらに、本発明のRNA合成の促進方法は、長鎖 d s RNAのみならず、短鎖 d s RNAの d s d s RNAの合成に利用することができる。当該 s d s

[0035]

さらに本発明の方法においては、核酸結合活性を有するタンパク質がRNA合成活性を有するタンパク質によるdsRNAの合成ならびにdsRNA分解活性を有するタンパク質のdsRNA分解の二つの反応を促進するため、特にRNA干渉において重要なdsRNAの合成ならびにsiRNAの生成系に利用することができる。この場合、各タンパク質は別個であってもよいし、融合タンパク質の形態であってもよい。

[0036]

(3) 本発明の方法に使用される組成物

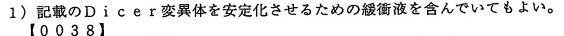
本発明の組成物は、特定の長さのdsRNAに分解する反応及び/又はRNAの合成反応を効率よく行うための組成物である。

当該組成物は、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテイン (Csp:cold shock protein)が好適に使用でき、配列表の配列番号 9記載のアミノ酸配列(配列表の配列番号 1 0記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列)を有するサーモトガ マリティマ(Thermotoga maritima)由来の<math>CspBタンパク質が好ましい。

[0037]

本発明の組成物には、dsRNA分解活性を有するタンパク質及び/又はRNA合成活性を有するタンパク質を含んでいてもよい。特定の長さのdsRNAを生成し得るdsRNA分解活性を有するタンパク質としては、Dicerの機能ドメインを有するものが好ましく、例えば、RNaseIIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるタンパク質が好適に使用できる。特に限定はされないが例えば、上記(1)記載のDicer変異体、天然型Dicerあるいは、市販のリコンビナントDicerのような機能的同等物のいずれであっても良い。当該Dicer変異体を含む組成物としては、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。また、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。

上記dsRNA分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列(例えば、Perfect DB配列等)、発現タンパク質精製用のタグ配列(例えば、His tag配列等)、あるいは発現タンパク質 のN末端側の付加配列を除去するための配列(例えば、Factor Xa配列等)などのアミノ酸配列を付加したタンパク質であっても良い。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12又は18記載のアミノ酸配列を有するdsRNA分解活性を有するタンパク質が挙げられる。さらに、本発明の組成物には、上記(



さらに、RNA合成活性を有するタンパク質としては、例えばT7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ等が好適に使用できる。

さらに本発明の組成物の別態様としては、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質と特定の長さのdsRNAを生成し得るdsRNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び/又は核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

本発明の組成物は、特定の長さのdsRNAへの効率の良い分解及び/又は一本鎖あるいは2本鎖RNAの合成反応を簡便に行なうことができる。

[0039]

また、本発明の組成物の一態様としては、長鎖 dsRNAのみならず、短鎖 dsRNA、例えば siRNAの合成に利用することができる組成物が挙げられる。当該組成物は、約 $10\sim100$ 塩基対、好ましくは約 $15\sim30$ 塩基対、特に好ましくは約 $20\sim25$ 塩基対の dsRNAを合成する際に有効である。

[0040]

(4) 本発明の方法に使用されるキット

本発明の方法に使用されるキットは、特定の長さの d s R N A に分解する反応及び/又はR N A の合成反応を効率よく行うためのキットである。

当該キットは、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテインが 好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテイン (Csp:cold shock protein)が好適に使用でき、配列表の配列番号 9記載のアミノ酸配列を有するサーモトガ マリティマ(Thermotogamaritima)由来のCspBタンパク質が好適に使用できる。

[0041]

本発明のキットには、特定の長さのdsRNAを生成する活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質及び/又はRNA合成活性を有するタンパク質を含んでいてもよい。該dsRNA分解活性を有するタンパク質及び/又はRNA合成活性を有するタンパク質としては、上記(3)で挙げられたものが好適に使用できる。さらに、本発明のキットには、上記(1)記載のDicer変異体を安定化させるための緩衝液を含んでいてもよい。

さらに本発明のキットの別態様としては、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質と特定の長さのdsRNAを生成し得るdsRNA分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び/又は核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

さらに、本発明のキットには、上記以外のコンポーネント、例えば反応の結果生成された特定の長さの d s R N A を精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。特に限定はされないが例えば、約21塩基対の s i R N A を精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い

本発明のキットを用いることで、特定の長さの d s R N A への効率の良い分解及び/又は R N A の合成を簡便に行なうことができる。

[0042]

また本発明のキットの一態様としては、長鎖 dsRNAのみならず、短鎖 dsRNA、例えば siRNAの合成に利用することができるキットが挙げられる。当該キットは、約 $10\sim100$ 塩基対、好ましくは約 $15\sim30$ 塩基対、特に好ましくは約 $20\sim25$ 塩基 対の dsRNAを合成する際に有効である。

【実施例】

[0043]

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに 限定されるものではない。

また、本明細書に記載の操作のうち、プラスミドの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については2001年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス(T. Maniatis) 5編集、モレキュラー クローニング:T ラボラトリー マニュアル第3版(Molecular Cloning : A Laboratory Manual 3rd ed.)に記載の方法によった。

[0044]

実施例1 ヒト由来DicerのRNaseIIIドメインの発現

(1) 発現ベクターの構築

配列表の配列番号 1 記載のヒト由来 D i c e r アミノ酸配列のN 末端側よりアミノ酸 1 2 7 1 \sim 1 9 2 4 (塩基番号 3 8 1 1 \sim 5 7 7 2)よりなるポリペプチドを発現させる ため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、ジーンバンク登録No. AB028449で公開されている塩基配列より、配列表の配列番号5及び6記載の塩基配列を有する合成プライマー1及び2をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー1は、制限酵素KpnIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号1271~1277に相当する塩基配列を塩基番号16~36にもつ合成DNAである。また、合成プライマー2は、制限酵素HindIIIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号1919~1924に相当する塩基配列を塩基番号18~36にもつ。

[0045]

上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

[0046]

[0047]

次に国際公開第99/27117号パンフレットの実施例1~6記載の方法に従い、 p C o l d 0 8 N C 2 ベクターを調製した。

[0048]

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シークエンシングすることにより確認し

、この組み換えプラスミドをpColdO8 hDi-Rとした。当該プラスミドは、plasmid pColdO8 hDi-Rと命名、表示され、平成15年8月11日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(郵便番号305-8566))にFERM P-19482として寄託されている。このpColdO8 hDi-Rは、ヒト由来Dicer アミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号1271~1924のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。前記プラスミドから発現させたタンパク質は、Perfect DB配列、His tag配列、並びにFactor Xa配列を有している。当該タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号12に、塩基配列を配列表の配列番号13に示す。

[0049]

(2) 発現、精製及び各種 b u f f e r 条件でのサンプル調製

上記(1)で調製した p Cold 08 h Di-Rを用いて大腸菌BL 21を形質転換し、その形質転換体を1.5%(w/v)濃度の寒天を含むLB 培地(アンピシリン50 μ g/ml含む)上で生育させた。生育したコロニーを2.5 mlのLB液体培地(アンピシリン50 μ g/ml含む)に植菌し、37℃で一晩培養した。この一部を100 mlの同LB 培地に植菌し、37℃で対数増殖期まで培養した。前記培養後、15℃に保温したインキュベーター内で10分間振とうした後、IPTGを終濃度1.0 mMになるように添加し、そのまま15℃で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、5 mlの細胞破砕溶液 [50 mM トリスー塩酸緩衝液(p H 7.5)、100 mM 塩化ナトリウム、0.5 mM EDTA、1% Triton(トライトン)X-100、1 mM ジチオスレイトール、2 mM フェニルメチルスルフォニルフルオライド]に再懸濁した。超音波破砕により菌体を破砕し、遠心分離(11,000 rpm 20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

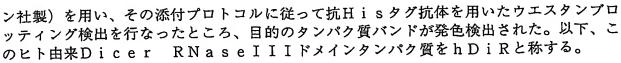
[0050]

上記上清の抽出液 約5mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように 行なった。

すなわち、樹脂容積にして1m1分のNi-NTA agarose (キアゲン社製)に bufferA [20mM トリスー塩酸緩衝液 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100]を10m1添加し、混和後、1,500 rpmで数分間遠心し、上清を廃棄して、約1m1の樹脂を回収した。菌体破砕液より調製した約5m1の上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂を ϕ 15mm0 mmのカラムに充填し、5m10 bufferAで2回洗浄した。次に5m10 bufferAで2回洗浄した。次に5m10 bufferB [20mM トリスー塩酸緩衝液 (pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、1mM ジチオスレイトール。1mM ジャスローの 1mM ジャスローの 1mM0 1mM0

[0051]

洗浄後、3mlobufferD[20mM] トリスー塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、100mM イミダゾール]で溶出操作を行った。次に、500mlobuffer 医[50mM] トリスー塩酸緩衝液(pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、0.1%トリトンX-100、1mM ジチオスレイトール]で透析を行ない、その後、セントリコン(rミコン社製)を用いて約10倍まで濃縮を行なった。この精製濃縮サンプルの一部について10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、分子量約76, 800のところに目的タンパク質のバンドが確認された。さらに、当該サンプルについてAntiHishmode



[0052]

さらに上記方法では b u f f e r D での溶出後、 b u f f e r E (これをタンパク質サンプル I とする) で透析を行なっているが、タンパク形状緩衝液の条件設定のため、以下の組成の緩衝液での透析も同様にして実施した。

1:bufferFを用いた透析 [50mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.0)、1 00mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トリトンX-100、 1mM ジチオスレイトール] →タンパク質サンプルII

2:bufferGを用いた透析 [50mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トリトンX-100、1mM ジチオスレイトール]→タンパク質サンプルIII

3:bufferHを用いた透析 [50mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.8)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トリトンX-100、1mM ジチオスレイトール] →タンパク質サンプルIV

[0053]

実施例2 dsRNA分解活性の測定

(1) 反応液の調製

上記実施例1-(2)で調製したタンパク質サンプル $I\sim IV$ についてそのDicer活性を測定した。当該活性測定は以下のようにして行った。

まず、活性測定に用いた基質となるdsRNAは、TurboScript T7 Transcription kit (GTS社製)を用いて、その添付プロトコルに従って合成した。

すなわち、プラスミドpQBI125 (和光純薬社製)に挿入されているRed-shift Green Fluorescent Protein (以下GFPと略称する)をコードする遺伝子 (配列表の配列番号11)について、プラスミドpDON-AI (タカラバイオ社製)に挿入したpDON-rsGFPを鋳型とし、配列表の配列番号7記載のT7プロモーター配列をもった合成プライマー3と配列表の配列番号8記載の合成プライマー4を用いてPCRを行い、増幅産物を得た。次に得られた2本鎖DNAを鋳型として、T7 RNA polymeraseによるRNA合成反応により約700bpの長さのdsRNAを調製した。

[0054]

上記方法で調製した dsRNA $1\mu g$ 、上記(2)で調製した hDiR $1\mu l$ 、1 0mM ATP溶液 $1\mu l$ 、50mM 塩化マグネシウム溶液 $1\mu l$ 、 $5\times$ 反応緩衝液(それぞれ最終透析に用いた緩衝液の 5 倍濃縮したもの) $2\mu l$ 、これに nucle ase free水を加えて、全量を $10\mu l$ としたものを反応液とした。

[0055]

また、市販のDicer (GTS社製) の場合は、Dicer酵素液 2μ l、基質となる dsRNA 1μ g、10mM ATP溶液 1μ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 0.5μ l、付属の反応緩衝液 4μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を 10μ l としたものを反応液とした。

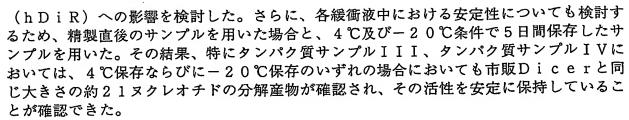
[0056]

以上の反応液を調製し、37℃で17時間反応後、 5μ 1を15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムブロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。電気泳動後にエチジウムブロマイド染色したゲルより、約21ヌクレオチドの分解産物の確認されたものを活性有とした。

[0057]

(2) 活性測定

上記 (1) で調製した反応液の活性測定を行い、RNaseIIIドメインタンパク質 出証特2004-3085963



[0058]

以上のことから、ヒト由来DicerのRNaseIIIドメインタンパク質(hDiR)は、pH8.5以上のトリスー塩酸緩衝液中、塩化マグネシウムが存在する条件で保存することで活性を安定化できることが判明した。

[0059]

実施例3 dsRNA生産及び分解に寄与する因子の検討

(1) dsRNA生産及び分解に寄与する因子を検討するために、常温域で核酸結合活性 を有するタンパク質について検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質は入手が困難であった。従って、配列表の配列番号 9記載のアミノ酸配列を有するサーモトガーマリティマ(Thermotogamaritima)由来のCspBタンパク質をモデルタンパク質として用いた。当該タンパク質は、プロテイン サイエンス(Protein Science)第8巻、394-403頁(1999)記載の方法で調製した。

[0060]

(2) サーモトガ マリティマ由来 CspBのdsRNA分解への効果

CspBを添加した形でのdsRNA分解活性は以下のように測定した。

すなわち、 $h\,D\,i-R\,e$ 酵素として用いた場合、実施例 1-(2) で調製した $h\,D\,i\,R$ (酵素液) $1\,\mu\,l$ 、上記 (1) で調製した $C\,s\,p\,B$ 溶液 $1\,\mu\,l$ 、基質として実施例 2-(1) で使用した $d\,s\,R\,N\,A$ $1\,\mu\,g$ 、 $1\,0\,m\,M$ $A\,T\,P$ 溶液 $1\,\mu\,l$ 、 $5\,0\,m\,M$ 塩化マグネシウム溶液 $1\,\mu\,l$ 、 $5\,\times$ 反応緩衝液 $[2\,5\,0\,m\,M$ $b\,U\,Z\,-$ 塩酸 $(p\,H\,8.\,5)$ 、 $5\,0\,0\,m\,M$ 塩化ナトリウム、 $0.\,5\,\%\,T\,r\,i\,t\,o\,n\,X\,-\,1\,0\,0$ 、 $5\,m\,M$ $D\,T\,T]$ $2\,\mu\,l$ 、これに $n\,u\,c\,l\,e\,a\,s\,e$ $f\,r\,e\,e\,x\,e\,m\,z\,\tau$ 、容量を $1\,0\,\mu\,l\,z$ したものを反応液とした。また市販のDicerの場合は、添付資料記載の組成に基質となる $d\,s\,R\,N$ $A\,e\,l\,\mu\,g\,m\,z$ 、これに $n\,u\,c\,l\,e\,a\,s\,e$ $f\,r\,e\,e\,x\,e\,m\,z\,\tau$ 、容量を $1\,0\,\mu\,l\,z$ した ものを反応液とした。なお市販のDicerについては、 $G\,T\,S\,d$ 、 $S\,t\,r\,a\,t\,a\,g\,e\,n\,e\,d$ 、 $I\,n\,v\,i\,t\,r\,o\,g\,e\,n\,d$ のを使用した。

[0061]

添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で $4.6ng/\mu1$ 、 $9.2ng/\mu1$ 、 $18.4ng/\mu1$ 、 $92ng/\mu1$ になるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を $1\mu1$ 添加した。

[0062]

以上の反応液を調製し、37℃で18時間反応後、 $5\mu1$ を15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い分解産物を確認した。さらに、当該ゲルをT o t a l Lab ver. l. ll (Nonlinear Dynamics社製)による画像解析によって、約21 ヌクレオチドのds RNA分解物の定量を行なった。その結果、市販Dicer及びRNaseIIIドメインタンパク質(hDiR)のいずれの場合においてもCspB添加によるdsRNAの分解量の向上が全ての添加量に関して確認できた。特に9.2ng/ $\mu1$ の前後で分解量が向上することが確認できた。

[0063]

すなわち、CspBを反応液中に添加することで、市販のDicer、RNaseII Iドメインタンパク質のいずれにおいてもdsRNA分解産物がより多く得られることが 明らかとなった。

[0064]

(3) サーモトガ マリティマ由来 Csp BのRNA 合成への効果

RNA干渉においては、dsRNAを合成するためにRNA合成系の活性を促進するこ とも重要であるとの見地に基づき、サーモトガ マリティマ由来 С s p B の R N A 合成へ の効果を検討した。モデル系として、T7 RNAポリメラーゼ系を選択した。RNA合 成系への影響については以下のようにして行った。すなわち、СѕрВを添加した形での RNAポリメラーゼによる転写量を目安とした。常法により調製したT7プロモー ターを有する p E T 1 6 b (ノバジェン社製) に配列表の配列番号 1 1 記載の塩基配列を 有する r s G F P 遺伝子を導入したプラスミドを鋳型 D N A として 1μ g 、 $1 0 \times T 7$ R NAポリメラーゼ用緩衝液(タカラバイオ社製) 2μl、50mM DTT RNaseインヒビター(タカラバイオ社製) 0.4 μ l、25mM NTP 2 μ l RNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製) 1μl、CspB溶液 1 μ 1、こ れにnuclease free水を加えて容量を20μ1としたものを反応液とし、3 7℃で4時間反応させた。なお本実施例でСspBタンパク質の濃度は終濃度で90ng /μl、180ng/μl、460ng/μl、920ng/μlになるように添加し、 無添加の場合のコントロールとしてС s p B の形状緩衝液である 1 0 m M リン酸カリウ ム緩衝液 (p H 7. 5) を 1 μ 1 添加した。

[0065]

(4) サーモトガ マリティマ由来CspBのdsRNA合成への効果

次にサーモトガ マリティマ由来 CspBodsRNA 合成に対する影響について検討した。本実施例においては、実施例 2-(1) で調製した dsRNA 合成用鋳型を利用した。RNAへの転写については、市販のTurboScript T7 Transcription kit(ジーンセラピーシステムズ社製)を用いて、その添付プロトコルに従った。なお、この際に添加した <math>CspB タンパク質の濃度は終濃度で $90ng/\mu$ 1、 $180ng/\mu$ 1、 $460ng/\mu$ 1、 $920ng/\mu$ 1 になるようにし、無添加の場合のコントロールとして CspB の形状緩衝液である 10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を 1μ 1 添加した。 37 $\mathbb C$ 、 4 時間反応後に 1μ 1 の DNaselle 1 を含む 1 % 1 が 1 で 1 を 1 の 1 で 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 の 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 の 1 の 1 で 1 の 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 の 1 で 1 の 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 の 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 で 1 の 1 で

[0066]

上記実施例と同様に別態様のT7 RNAポリメラーゼ転写系についても検討した。すなわち、実施例 2 - (1) で調製した d s RNA合成用鋳型 1 μ g、1 0×T 7 RNAポリメラーゼ緩衝液(タカラバイオ社製) 1 μ 1、5 0 mM DTT 1 μ 1、RNaseインヒビター(タカラバイオ社製) 0.2 μ 1、2 5 mM NTP 1 μ 1、T 7

RNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製) 0. 5μ 1、CspB溶液 1μ 1、これに nuclease free水を加えて容量を 10μ 1としたものを反応液とし、37 ℃で4時間反応させた。なおこの際に添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で90 ng/ μ 1、180 ng/ μ 1、460 ng/ μ 1、920 ng/ μ 1になるようにし、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を 1μ 1添加した。反応後のサンプルにDNaseI(タカラバイオ社製)を 0.5μ 1加えて、37℃で15分間反応させた。この反応液の40倍希釈液 1μ 1をエチジウムブロマイドを含む1%7ガロースゲル電気泳動に供した。そのゲルについても dsRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が920ng/ μ 1以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約3倍以上なることが確認できた。

[0067]

以上のように、CspBを反応液中に添加することで、T7 RNAポリメラーゼによる転写産物がより多く得られることが明らかとなった。この効果は、1本鎖RNA合成ならびに2本鎖RNA合成のいずれの場合においても確認できた。

[0068]

実施例4 ヒト由来DicerのPAZ+RNaseIIIドメインの発現

(1) 発現ベクターの構築

配列表の配列番号 1 記載のヒト由来 D i c e r アミノ酸配列のN 末端側よりアミノ酸 $679\sim1924$ (塩基番号 $2035\sim5772$) よりなるポリペプチドを発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、ジーンバンク登録No. AB028449で公開されている塩基配列より、配列表の配列番号14及び15記載の塩基配列を有する合成プライマー5及び6をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー5は、制限酵素KpnIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号679~685に相当する塩基配列を塩基番号16~36にもつ合成DNAである。また、合成プライマー6は、制限酵素HindIIIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号1919~1924に相当する塩基配列を塩基番号18~35にもつ。

[0069]

-上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

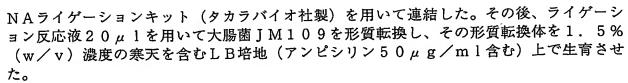
すなわち、鋳型DNA (ヒトcDNAライプラリー、Human Pancreas、タカラバイオ社製) 2μ 1、 5μ 1の $10\times$ LA PCR buffer (タカラバイオ社製)、 5μ 1のdNTP混合液(タカラバイオ社製)、10pmolの合成プライマー 5、10pmolの合成プライマー 6、0. 5UのTakara LA Taq (タカラバイオ社製)を加え、滅菌水を加えて全量を 50μ 1とした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ社製)にセットし、94 \mathbb{C} 1分、55 \mathbb{C} 1分、72 \mathbb{C} 3分を1 サイクルとする30 サイクルの反応を行なった。

[0070]

反応終了後、該反応液 $5 \mu 1$ を 1.0 % P ガロースゲル電気泳動に供した。確認された目的の約 2.7 k b p の D N A フラグメントを電気泳動ゲルより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収 D N A を $5 \mu 1$ の滅菌水に懸濁し、制限酵素 K p n I (タカラバイオ社製)及び制限酵素 H i n d I I I (タカラバイオ社製)で2 重消化し、1.0 % P ガロースゲル電気泳動によりその K p n I - H i n d I I I 消化物を抽出精製し、K p n I - H i n d I I I 消化 D N A 断片を得た。

[0071]

次に実施例1-(1)で調製したpCold08NC2ベクターを上記KpnI-HindIII消化DNA断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記KpnI-HindIII消化DNA断片と混合し、D



[0072]

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シークエンシングすることにより確認し、この組み換えプラスミドをpColdO8 hDi-ASIとした。当該プラスミドは、plasmid pColdO8 hDi-ASIと命名、表示され、平成15年9月26日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(郵便番号305-8566))にFERM P-19536として寄託されている。このpColdO8 hDi-ASIは、ヒト由来Dicerアミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸番号679~1924のアミノ酸配列をコードする塩基配列(配列表の配列番号16記載の塩基配列、配列番号17記載のアミノ酸配列)を含むプラスミドである。前記プラスミドから発現させたタンパク質は、PerfectDB配列、His tag配列、並びにFactor Xa配列を有している。当該タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号18に、塩基配列を配列表の配列番号19に示す。

[0073]

(2) 発現、精製

上記(1)で調製したpCold08 hDi-ASIを用いて大腸菌BL21-CodonPlus-RIL strain(ストラタジーン社製)を形質転換し、その形質転換体を1.5%(w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/ml含む)上で生育させた。生育したコロニーを2.5mlのLB液体培地(アンピシリン50 μ g/ml含む)に植菌し、37℃で一晩培養した。この一部を100mlの同LB培地に植菌し、37℃で対数増殖期まで培養した。前記培養後、15℃に保温したインキュベーター内で10分間振とうした後、IPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、そのまま15℃で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、5mlの細胞破砕溶液 [50mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トライトンX-100、1mM ジチオスレイトール、1mM フェニルメチルスルフォニルフルオライド]に再懸濁した。超音波破砕により菌体を破砕し、遠心分離(11,000rpm 20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

[0074]

上記上清の抽出液 約5mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように 行なった。

すなわち、樹脂容積にして1 m 1分のN i - NTA agarose (キアゲン社製)に bufferA [20 m M トリスー塩酸緩衝液(p H 8.5)、100 m M 塩化ナトリウム、1 m M ジチオスレイトール、1 m M 塩化マグネシウム、0.1%トライトンX-100]を10 m 1添加し、混和後、1,500 rpmで数分間遠心し、上清を廃棄して、約1 m 1の樹脂を回収した。菌体破砕液より調製した約5 m 1の上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂を $\phi 15 m m$ のカラムに充填し、5 m 1 の buffer A で 2 m 1 回洗浄した。次に5 m 1 の buffer B [20 m M トリスー塩酸緩衝液(p H 8.5)、10 m M 塩化ナトリウム、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M ジチオスレイトール、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M ジチオスレイトール、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M 塩化ナトリウム、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M 塩化ナトリウム、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M 塩化ナトリウム、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M ジチオスレイトール、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M ダチオスレイトール、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M ジチオスレイトール、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M ジチオスレイトール、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M ジチオスアイトール、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M ジチオスアイトール、1 m M 塩化マグネシウム、1 m M ジチオスアイトール。1 m M 塩化マグネシウム、1 m M 塩化マグネシー

[0075]

洗浄後、3mlobufferD[20mM]トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、100mM イミダゾール]で溶出操作を行った。次に、500mlobufferE[50mM]トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トリトンX-100、1mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トリトンX-100、1mM ジチオスレイトール]で透析を行ない、その後、セントリコン(アミコン社製)を用いて約10倍まで濃縮を行なった。その一部について10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、大腸菌BL21-CodonPlus-RIL strain (ストラタジーン社製)を宿主として用いたサンプルで分子量約144,000のところに目的タンパク質のバンドが確認され、これを以下の活性の確認に使用した。以下、このヒト由来Dicer PAZ+RNaseIIIドメインタンパク質をhDi-ASIとする。

[0076]

(3) dsRNA分解活性の測定

上記実施例 4-(2) で調製したタンパク質サンプルについて、実施例 2 記載の方法でその dsRNA 分解活性を測定した。

その結果、電気泳動後にエチジウムブロマイド染色したゲルより、約21ヌクレオチドの分解産物が確認され、RNaseIIIドメインタンパク質(hDiR)とPAZ領域を含むタンパク質(hDi-ASI)においてもdsRNA分解活性が確認された。

[0077]

さらに、凍結・融解における安定性についても検討するため、-80 C条件で上記タンパク質サンプルを凍結、その後、室温で融解させるという操作を6回、及び10回繰り返した。また、コントロールとして実施例<math>1-(2) で調製したhDiRについても同様の検討を行った。

その結果、PAZ+RNaseIIIFメインタンパク質(hDi-ASI)の場合、 凍結・融解を6回、<math>10回繰り返しても分解活性を保持していた。一方、hDiRについては6回の凍結・融解まで活性は確認された。このことから、RNaseIIIFメインにさらに PAZFメインを含むことにより当該タンパク質は、より多くの凍結・融解に対する安定性を獲得することが確認できた。

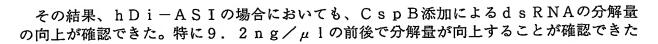
[0078]

(4) 分解に寄与する因子についての検討

上記実施例 4-(2) で調製した hDi-ASI について、常温域で核酸結合活性を有するタンパク質の影響を検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質としては、上記実施例3で調製したサーモトガマリティマ由来のCspBタンパク質を用いた。また、dsRNA分解への効果については、以下のように測定した。

以上の反応液を調製し、37℃で17時間反応後、 5μ 1を15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い切断産物を確認した。 さらに、当該ゲルをTotal Lab ver. 1. 11 (Nonlinear Dynamics社製) による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物の定量を行なった。



[0079]

すなわち、CspBは、RNaseIIIドメインを含む天然型、あるいは変異型のヒト由来DicerのいずれにおいてもそのdsRNA分解活性を促進することが確認できた。

[0080]

実施例5

本発明のヒト由来 h D i R を用いて調製した s i R N A の R N A 干渉の効果について検討した。対照として、市販の D i c e r (G T S 社)を用いた。 d s R N A 分解産物の調製は、基本的に上記実施例 2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例 1-(2)記載の h D i R 並びに市販の D i c e r を 1 0 単位用いて、 d s R N A 1 0 μ g 分を、 3 7 $\mathbb C$ 、 1 8 時間で切断した。これらの切断産物を R N A P u r i f i c a t i o n C o l u m n 1、 2 (G e n e The r a p y S y s t e m s 社製)を用いて精製し、これらを以下の R N A 干渉の評価に使用した。

[0081]

すなわち、siRNA導入を行なう24時間前に293細胞を、10%FBSおよび1 %penicillin/streptomycinを含むD-MEM培地(SIGMA 社製) で適当量 (cell数: 5×10⁴) 24 wellプレートにまき、一晩CO₂ イ ンキュベーター内で培養した。約80%コンフレントになった状態で50μ1の無血清培 地に3µ1のTransIT 293 Transfection Reagent (タ カラバイオ社製)を加え、激しく撹拌した。室温で 5 分間放置し、0 . 3 μ g の p Q B I25 (和光純薬社製)を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。そこに4μ1 のTransIT-TKО試薬を加えて穏やかに混和し、室温で5分間放置した。そこに 上記siRNAを500ng加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置し、これをDNA /siRNA溶液とした。Well中の10%FBSを含むD-MEM培地を250μl になるように添加したものに、DNA/siRNA溶液を滴下し、Well内の溶液が均 一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、0.3μgのpQB I 2 5 (和光純薬社製) のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行な った。その後CO2インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Va ntage (ベクトン・ディッキンソン社製) を用いたフローサイトメトリーに供し、ベ クター (DNA) のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合の GFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表1に示す。

【0082】 【表1】

導入サンプル	平均蛍光強度
コントロール (無添加)	8.09
コントロール (ベクターのみ)	1331.44
hDiR	14.92
市販Dicer	71.57

[0083]

表1に示したように、コントロール(ベクターのみ)と比較してその平均蛍光値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、hDiRによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNA干渉効果を示し、市販Dicerのものよりも強いRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明のhDiRがRNA干渉ためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

[0084]

実施例 6

本発明のhDiRを用いて調製したsiRNAのRNA干渉の効果について、siRNAの添加量を換えて検討した。対照として、市販のDicer (Gene Therapy Systems社製)を用いた。dsRNAの切断については、基本的に上記実施例 2-(1) 記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2) 記載のhDiR並びに市販のDicerを $10\mu1$ 用いて、dsRNA 10μ g分を、37℃、18時間で切断した。なおこの際には、実施例3-(2)で使用したCspBを最終濃度9.2ng/ $\mu1$ になるように添加し、反応させた。

これらの切断産物をRNA Purification Column 1、2 (Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

[0085]

すなわち、siRNA導入を行なう 24時間前に 293細胞を、10%FBSおよび $1\%penicillin/streptomycinを含むD-MEM培地(SIGMA社製)で適当量(<math>cell数:1.5\times10^5$)を 24 well 1プレートにまき、一晩 $Coldsymbol{O}_2$ インキュベーター内で培養した。この培養細胞が約 95% コンフレントになった時点で、 $49\mulom$ 血清培地に $1\mulom$ Genejuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製)を加え、激しく撹拌した。室温で 5分間 放置 し、 0.3μ gの pQBI 25(和光純薬社製)を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

同時に、別チューブに 47μ lの無血清培地に 3μ lのRibojuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製)を加えたものを用意し、激しく撹拌した。室温で5分間放置し、上記siRNA 166.7 ng、55.6 ng、18.5 ngを加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

このように調製した 2 種類の溶液を、Well中の10% FBSを含むD-MEM培地を250 μ 1になるように添加したものに滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、ベクター(DNA)のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO2インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、ベクター(DNA)のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合のrsGFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表2に示す。

【0086】

1201	
導入サンプル	平均蛍光強度(相対値)
コントロール(無添加)	0
コントロール (ベクターのみ)	100
hDiR 166.7ng	18.21
hDiR 55.6ng	18.97
hDiR 18.5ng	32.67
市販Dicer 166.7ng	17.74
市販Dicer 55.6ng	19.80
市販Dicer 18.5ng	32.34
INDICET TO: OHS	

[0087]

表2に示したように、コントロール(ベクターのみ)と比較して平均蛍光強度の値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、hDiRによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明の h D i R が R N A 干渉のための s i R N A 調製に有用であることが確認できた。

[0088]

上記細胞サンプルについてtotal RNAを抽出しreal time RT-PCRに供しrsGFPのmRNAを定量する事で、RNA干渉の評価を行った。

[0089]

すなわち、siRNA導入後CO2インキュベーターで37℃、24時間培養した細胞 からtrizole(Invitrogen社製)を使用してトータルRNAを抽出、精 製した。なおこの際の作業は、添付のプロトコルに従って行った。そのトータルRNAを 80ng、 $5 \times M-MLV$ buffer (タカラバイオ社製) 4μ l、10mM dNTP (タカラバイオ社製) 1μl、random hexamer 100pmol、R Nase Inhibitor (タカラバイオ社製) 20U、M-MLV Revers e Transcriptase 100U、を加え、滅菌水で全量を20μ1とした。 前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイ オ社製) にセットし、42℃ 10分、95℃ 2分の反応を行った。この反応液に20 μ1の反応希釈液 (1×M-MLV buffer、0.5mM dNTP mixtu re) を加え、これを 10μ 1ずつに分注した。前述の反応物 10μ 1に、 $10\times R-P$ CR buffer (タカラバイオ社製) 2. 5μ l、250 mM Mg^{2+} 0. 3μ 1、10mM dNTP 0.75μl、TaKaRa Ex Taq R-PCR (タ カラバイオ社製) 1. 25U、滅菌水で3000倍希釈したSYBR Green (タカ ラバイオ社製) 2. 5μ l、100% DMSO 1. 25μ lを加え、β – a c t i n (タカラバイオ社製)、GAPDH (タカラバイオ社製)、rsGFP (rsGFP-F :配列番号20、rsGFP-R:配列番号21)、Neo(Neo-F:配列番号22 、Neo-R:配列番号23)を検出するための合成プライマーを5pmo1ずつ加え、 滅菌水で全量を25µ1とした。前記反応液をSmart Cycler II Uni t (タカラバイオ社製) にセットし、95℃、10秒で熱変性を行った後、95℃ 5秒 、60℃ 20秒を1サイクルとする45サイクルの反応を行なった。得られたデータを 解析することで,ヒト由来の β ーactin、GAPDH、および導入プラスミド由来の rsGFP、NeoのmRNA量を定量した。その結果を表3に示す。

【0090】

【衣 3】	
導入サンプル	rsGFP mRNA量(相対値)
コントロール (無添加)	0
コントロール (ベクターのみ)	100
hDiR 166.7ng	15.92
hDiR 55.6ng	22.72
hDiR 18.5ng	30.61
市販Dicer 166.7ng	14.77
市販Dicer 55.6ng	30.91
市販Dicer 18.5ng	35.84

[0091]

表3に示したように、コントロール(ベクターのみ)と比較して r s G F P の m R N A 量が小さいほど R N A 干渉が起こっている。従って、h D i R は、市販 D i c e r と同様に R N A 干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明の h D i R は、R N A 干渉のための s i R N A 調製に有用であることが確認できた。

[0092]

実施例7

上記実施例 1-(2)、実施例 4-(2) で調製したサンプルについてそのdsRNA 分解活性の基質となるdsRNAをルシフェラーゼ遺伝子より作製し評価した。実施例 2-(1) と同様にdsRNAは、TurboScript T7 Transcript

ion kit (GTS社製)を用いて、その添付プロトコルに従って合成した。 【0093】

すなわち、プラスミド p G L 3 - B a s i c ベクター(プロメガ社製)に挿入されているルシフェラーゼをコードする遺伝子について、プラスミド p G L 3 - B a s i c ベクター(プロメガ社製)を鋳型とし、配列表の配列番号 24 記載のT7プロモーター配列をもった dsl-1プライマーと配列表の配列番号 25 記載の dsl-2プライマーを用いて P C R (増幅断片長約 500 塩基対)を行い、増幅産物を得た。次に得られた 2 本鎖 D N A を鋳型として、T7 R N A ポリメラーゼによる R N A 合成反応により約 500 b p の長さの ds R N A を調製した。

[0094]

本発明のhDiR、hDi-ASIを用いて調製したsiRNAのRNA干渉の効果について検討した。対照として、市販のDicer (Gene Therapy Systems社製)を用いた。dsRNAの切断については、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載のhDiR、実施例4-(2)記載のhDi-ASI並びに市販のDicerを10 μ 1用いて、上記のdsRNA10 μ g分を、37 $\mathbb C$ 、18時間で切断した。なおこの際には、実施例3-(2)で使用したCspBを最終濃度9.2ng/ μ 1になるように添加し、反応させた。

これらの切断産物をRNA Purification Column 1、2 (Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

[0095]

同時に、別チューブに 47μ lの無血清培地に 3μ lのRibojuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製)を加えたものを用意し、激しく撹拌した。室温で5分間放置し、上記siRNAを166.7ng、55.6ng、18.5ngを加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

このように調製した 2 種類の溶液を、Well中の10% FBSを含むD-MEM培地を250 μ 1になるように添加したものに滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、ベクター(DNA)のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO2インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をDual Luciferase Reporterassay kit (Promega社製)を用いたアッセイに供することで、ベクター(DNA)のみを導入したものに対する、siRNAを添加した場合のGL3タンパク質発現の阻害効果を測定した。その結果を表4に示す。

[0096]

【表4】

	O - O TO HE LIMITED
導入 s i R N A サンプル	GL3発現量:相対値
コントロール(無添加)	0
コントロール (ベクターのみ)	100
hDiR 166.7ng	25.70
hDiR 55.6ng	38.90
hDiR 18.5ng	74.51
hDi-ASI 166.7ng	25.87
hDi-ASI 55.6ng	25.00
hDi-ASI 18.5ng	31.09
市販Dicer 166.7ng	25.11
市販Dicer 55.6ng	30.15
市販Dicer 18.5ng	55.41

[0097]

表4では、コントロール(ベクターのみ)と比較してそのGL3発現量の値が小さいほどRNA干渉が起こっていると考えられる。従って、hDiR、hDi-ASIによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNA干渉効果を示すことが確認できた

以上のことから、本発明のhDiR、hDi-ASIがRNA干渉のためのsiRNA 調製に有用であることが確認できた。

[0098]

実施例8

本発明のhDiR、hDi-ASIを用い、CspBを添加して調製したsiRNAと無添加で調製したsiRNAについて、そのRNA干渉の効果について検討した。なお実際の操作は実施例7記載のルシフェラーゼを用いた方法に習った。対照として、市販のDicer (Gene Therapy Systems社製)を用いた。dsRNAの切断については、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載の方法で調整したhDiR、実施例4-(2)記載の方法で調整したhDi-ASI並びに市販のDicerを10 μ 1用いて、上記のdsRNA10 μ g分を、37 $\mathbb C$ 、18時間で切断した。なおこの際には、実施例3-(2)で使用したCspBを最終濃度9.2ng/ μ 1になるように添加した場合と添加しない場合とで反応させた。

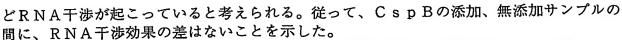
これらの切断産物をRNA Purification Column 1、2 (Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

【0099】 【表5】

導入 s i R N A サンプル	GL3発現量:相対値
コントロール(無添加)	0
コントロール(ベクターのみ)	100
hDiR 55.6ng+CspB	9.66
hDiR 55.6ng	16.40
hDi-ASI 55.6ng+CspB	14.31
hDi-ASI 55.6ng	13.19
市販Dicer 55.6ng+CspB	10.40
市販Dicer 55.6ng	12.07

[0100]

表5では、コントロール (ベクターのみ) と比較してそのGL3発現量の値が小さいほ



以上のことからRNA干渉のためのsiRNA調製の際に、本発明のCspBがsiRNAに対し、質的な影響を与えないことが確認できた。

[0101]

実施例 9 酵素の安定性

実施例 4-(2) で精製した PAZドメイン+RNaseIIIドメインタンパク質(hDi-ASI)に CspBを終濃度で 92ng/ μ lになるように加えたものを保存緩衝液 I (50 mMトリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、250 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1 mM DTT、0.1% TritonX-100、50% グリセロール)中で保存し、一定期間ごとに以下のようにして、そのdsRNA分解活性を測定した。実施例 2-(1) で調製したdsRNA 1μ g、上記 4-(2) で調製したタンパク質サンプル 1μ l、 $5\times$ 反応緩衝液(100 mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、750 mM 塩化ナトリウム、12.5 mM 塩化マグネシウム) 2μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を 10μ lとしたものを反応液とした。37 で 18 時間反応後、 5μ lを15 %ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムプロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。その結果、6 ヶ月以上の保存サンプルにおいて約 21 塩基対の分解産物が確認され、21 以上の保存サンプルにおいて約 21 塩基対の分解産物が確認され、21 以上保持された。

[0102]

実施例10 pCold14-TmCspBの作製、組み換え体の培養、及び精製(1)pCold14-TmCspBの作製

以下のThermotoga maritima由来のCspB(以降、TmCspBとする)のクローニングに際しては、プロテイン サイエンス(Protein Science)、第8巻、394-403頁(1999)記載の配列(アミノ酸配列を配列番号9、塩基配列を配列番号10に示す。)を参照した。

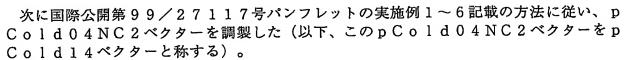
まず、配列表の配列番号 26 及び 27 記載の塩基配列を有する合成プライマーE及びFをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーEは、制限酵素NdeIの認識配列を塩基番号 $11\sim16$ に、さらにTmCspBのアミノ酸配列(配列番号 26)のアミノ酸番号 $1\sim7$ に相当する塩基配列を塩基番号 $14\sim34$ にもつ合成DNAである。また、合成プライマーFは、制限酵素 BamHIの認識配列を塩基番号 $11\sim16$ に、TmCspBのアミノ酸配列(配列番号 26)のアミノ酸番号 $61\sim66$ に相当する塩基配列を塩基番号 $20\sim37$ にもつ合成DNAである。

[0103]

上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

すなわち、実施例 3-(1) の鋳型 DNA 1μ 1 (50 ng)、 5μ 1 の $10\times E$ x Taq buffer (9カラバイオ社製)、 5μ 1 のd NT P混合液(タカラバイオ社製)、10 pmolの合成プライマーE、10 pmolの合成プライマーF、0.5 Uの Takara Ex Taq (9カラバイオ社製) を加え、滅菌水を加えて全量を 50 μ 1 とした。前記反応液を Ta Ka Ra PCR Thermal Cycler SP (9カラバイオ社製) にセットし、94 $\mathbb{C}1$ \mathcal{D} 、55 $\mathbb{C}1$ \mathcal{D} 、72 $\mathbb{C}1$ \mathcal{D} を 1 サイクルの反応を行なった。

[0104]



[0105]

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シークエンシングすることにより確認した。

[0106]

(2) CspBの5リットルジャーでの培養、及び精製

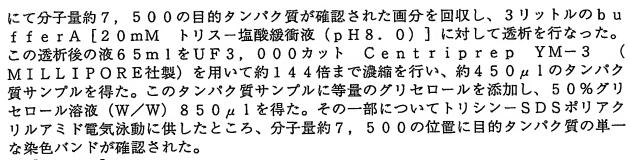
上記実施例10-(1) で調製したpCold14-TmCspBを用いて、大腸菌B L 2 1 を形質転換し、その形質転換体を1. 5%(w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50μg/m1含む)上で生育させた。生育したコロニーを30m1のLB 液体培地 (bacto-tryptone 0.3g、bacto-yeast ract 0.15g、NaCl 0.15g、アンピシリン1.5mg) に植菌し、3 7℃で一晩培養した。この培養液30m1分を3リットルのLB液体培地(bactotryptone 30g, bacto-yeast extract 15g, NaC 1 15g、アンピシリン150mg)を含む5リットルジャーファーメンター (エイブ ル社製)に植菌後、150rpm、Air=0.5リットル/min、37℃の条件で対 数増殖期まで培養し、その後、15℃に冷却した。冷却後にIPTGを終濃度1.0mM になるように添加し、150rpm、Air=0.5リットル/min、15℃の条件で 24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、11gの湿菌体を 得た。湿菌体11gを44mlのbufferA[20mM トリスー塩酸緩衝液(pH 8. 0)] に再懸濁した。超音波破砕により菌体を破砕し、遠心分離(10,000×g 20分) により上清の抽出液と沈殿とに分離した。この上清の抽出液をさらに超遠心分 離(70,000×g 20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

[0107]

上記上清の抽出液、約53mlを水浴上で熱処理(70 $\mathbb C$ 、10分)を行い、遠心分離(10,000×g 20分)により上清と沈殿とに分離した。この熱処理上清に終濃度200mMとなるようにNaClを添加し、さらにbufferB[20mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.0)、200mM 塩化ナトリウム]で平衡化したAnionExchanger DE52 10mリットルを添加し、4 $\mathbb C$ で一晩緩やかに攪拌した。遠心分離(3,000×g 20分)により上清と沈殿とに分離し、上清をさらにガラスフィルターで濾過を行った。この濾液45mlにつき、3リットルのbufferA[20mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.0)]に対して透析を行なった。

[0108]

 ϕ 20mmのカラムに充填した樹脂容積にして100ml分のQ-Sepharose F. F. (アマシャム・バイオサイエンス社製)に透析後の液50mlを添加し、400mlのbufferA [20mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.0)]で洗浄を行った。この非吸着画分を回収し、UF30,000カット Centriprep YM-30 (MILLIPORE社製)を通過させた。このUF通過液260mlを ϕ 30mmのカラムに充填した40mlのHeparin Sepharose CL-6B (アマシャム・バイオサイエンス社製)に添加し、160mlのbufferA [20mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.0)]で洗浄を行なった。その後、200mlのbufferA [20mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.0)]の0~1M塩化ナトリウムグラジエントで目的タンパク質の溶出を行なった。トリシン-SDSポリアクリルアミド電気泳動



[0109]

(3) С s p B タンパク質による切断活性の上昇について。

次に実施例実施例1-(2)、実施例4-(2)で調製したタンパク質サンプルについて、核酸結合活性を有するタンパク質(CspB)の影響を検討した。なおこの際には、実施例10-(2)で調製したTmCspBを用いた。

[0110]

実施例11 hDi-ASIの30リットルジャーでの培養、及び精製

(1) 祭刊 糖製

mM 塩化マグネシウム、プロテアーゼインヒビター(Complete、EDTA-free、ベーリンガーマンハイム社製)]に再懸濁した。超音波破砕により菌体を破砕し、遠心分離(12,000rpm 30分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。上記上清の抽出液 約56mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

[0111]

すなわち、樹脂容積にして16ml分のNi-NTA agarose(キアゲン社製)に細胞破砕溶液を50ml添加し、混和後、1, 500rpmで数分間遠心し、上清を廃棄する操作を20繰り返して、約8mlの樹脂を回収した。菌体破砕液より調製した約56mlの上清を添加し、4 $\mathbb C$ で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂を ϕ 20mmのカラムに充填し、40mlの細胞破砕溶液 [50mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、プロテアーゼインヒビター(Complete, EDTA-free、ベーリンガーマンハイム社製)] で洗浄した。次に40mlのbufferA [20mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール、20mM イミダゾール]で樹脂を洗浄後、40mlのbufferB [20mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、80mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール、20mM イミダゾール]、続いて40mlのbufferA 5mm 次の所列の管法を行った。

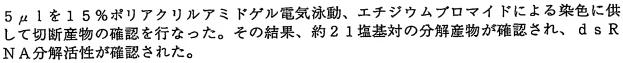
洗浄後、24mlのbufferC[20mM] トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール、100mM イミダゾール]で溶出操作を行った。次に、300mlのbufferD[20mM] トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール]に対して透析を行なった。

[0112]

透析後の酵素溶液をφ10mmのカラムに充填した1mlのHeparin Seph arose CL-6B (アマシャムバイオサイエンス社製) に添加し、5mlのbuf fer D[20mM トリスー塩酸緩衝液 (pH8.5)、100mM 塩化ナトリウ ム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール]で洗浄を行なった。次に、5m lのbuffer E[20mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、200mM 塩 化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール]、その後、5mlの buffer F[20mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.5)、400mM 塩化ナ トリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール]、5mlのbuffer G [20mM トリスー塩酸緩衝液 (pH8.5)、800mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール]でタンパク質の溶出を行なった。その 後、各溶出サンプルについてCentricon YM-10 (アミコン社製)を用いて 約20倍まで濃縮を行ない、約250μlのタンパク質サンプルを得た。その一部につい て10%SDSポリアクリルアミド電気泳動に供したところ、分子量約144,000の 位置に目的タンパク質のバンドが確認され、これを以下の活性の確認に使用した。以上の 過程で発現、精製されたものを、実施例4-(2)で大腸菌BL21-Co.donPlu s-RIL strain (ストラタジーン社製)を宿主として発現、精製したものと比 較すると100ml培養液あたりの活性で約2倍程度の収量を得ることができた。

[0113]

(2) dsRNA分解活性の測定



[0114]

(3) С s p B タンパク質による切断活性の上昇について

次に実施例11-(1) で調製したタンパク質サンプルについて、核酸結合活性を有するタンパク質 (CspB) の影響を検討した。

すなわち、実施例 10-(3) と同様にして、実施例 11-(1) で調製したタンパク質サンプル (酵素液) 1μ 1、実施例 10-(2) で調製したCspB溶液 1μ 1、実施例 2-(1) で調製した基質となる d s R N A 1μ g、5 × 反応緩衝液 (100mM) トリスー塩酸緩衝液 (pH8.5)、750mM 塩化ナトリウム、12.5mM 塩化マグネシウム) 2μ 1、これに nu c 1 e a s e f r e e f r e e f r e e f r e e f r e e f r e e f r e e f r e e f r e e f r

[0115]

その結果、本発明のPAZ+RNaseIIIドメインを含む変異体タンパク質(hDi-ASI)を用いた場合において、CspB添加によるdsRNAの分解量の向上が確認でき、さらには、未切断の基質がほとんど存在せず、ほぼ全てが分解されていることが確認された。一方、市販のDicerの場合は、dsRNA分解の上昇が確認されるものの、半分程度の未切断の基質が存在していることが確認された。

すなわち、本発明のタンパク質を用いた場合、CspB添加により基質を完全に分解することが可能であることが明らかとなった。

[0116]

実施例12 hDi-ASIによる切断産物のRNAi効果

実施例 11-(1) のタンパク質を用いて調製した s i RNAのRNA干渉の効果について検討した。対照として、市販のD i c e r (GTS社)を用いた。 d s RNA分解産物の調製は、基本的に上記実施例 11-(3) 記載の方法で行った。なお h D i -A S I の場合には、実施例 10-(2) で調製した C s p B を終濃度で 9. 2 n g/μ 1 になるように添加した。すなわち、実施例 11-(1) 記載の酵素に C s p B を添加したもの、並びに市販のD i c e r e

[0117]

すなわち、siRNA導入を行なう 24時間前に 293細胞を、10% FBSおよび 1% penicillin/ $streptomycinを含むD-MEM培地(SIGMA社製)で適当量(<math>cell数:1.5\times10^5$)を 24 well穴プレートにまき、一晩 CO_2 インキュベーター内で培養した。この培養細胞が約 95% コンフレントになった時点で、 49μ lの無血清培地に 1μ lのGenejuice Transfecti

on Reagent (タカラバイオ社製)を加え、激しく撹拌した。室温で 5 分間放置し、0.3 μ gのp Q B I 2 5 (タカラバイオ社製)を加えて、穏やかに混和し、5 分間室温で放置した。

同時に、別チューブに 47μ lの無血清培地に 3μ lのRibojuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製)を加えたものを用意し、激しく撹拌した。室温で5分間放置し、上記siRNAを55. 6ngを加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

[0118]

このように調製した 2 種類の溶液を、Well中の10% FBSを含むD-MEM培地を250 μ 1になるように添加したものに滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、ベクター(DNA)のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO2インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、ベクター(DNA)のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合のrsGFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表6に示す。

[0119]

【表 6】

平均蛍光強度
3.52
1120.08
93.09
278.59

[0120]

表6に示したように、コントロール(ベクターのみ)と比較してその平均蛍光値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、hDiーASI+CspBによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNAi効果を示し、RNAiに有効であることが示された。さらに、効率よくsiRNAを生産することができ、同量のsiRNAを使用した場合、市販の酵素より高いRNAi効果が得られることを確認した。

以上のことから、本発明の方法で調製したタンパク質がRNA干渉ためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

[0121]

本発明により特定の長さのdsRNAを生成するdsRNA分解活性を有するタンパク質が提供される。また、本発明の方法によりRNA干渉等において有用な、特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び/又はRNA合成促進方法が提供される。さらに本発明の特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び/又はRNA合成促進方法を簡便に実施することができる組成物ならびにキットが提供される。

【配列表フリーテキスト】

[0122]

SEQ ID NO:3; A gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:4; An amino acid sequence of human dicer mutant

SEQ ID NO:5; Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:6; Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:7; Synthetic primer 3 to amplify a gene encoding red-shifted green flu orescence protein

SEQ ID NO:8; Synthetic primer 4 to amplify a gene encoding red-shifted green flu orescence protein

SEQ ID NO:14; Synthetic primer 5 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:27; Synthetic primer F to amplify a gene encoding CspB

SEQ ID NO:15; Synthetic primer 6 to amplify a gene encoding human dicer mutant SEQ ID NO:16; A gene encoding human dicer mutant SEQ ID NO:17; An amino acid sequence of human dicer mutant SEQ ID NO:18; An amino acid sequence of human dicer mutant SEQ ID NO:19; A gene encoding human dicer mutant SEQ ID NO:20; Synthetic primer rsGFP-F to amplify a gene encoding rsGFP SEQ ID NO:21; Synthetic primer rsGFP-R to amplify a gene encoding rsGFP SEQ ID NO:22; Synthetic primer Neo-F to amplify a gene encoding Neo SEQ ID NO:23; Synthetic primer Neo-R to amplify a gene encoding Neo SEQ ID NO:24; Synthetic primer ds1-1 to amplify a gene encoding luciferase SEQ ID NO:25; Synthetic primer ds1-2 to amplify a gene encoding luciferase SEQ ID NO:26; Synthetic primer E to amplify a gene encoding CspB

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> The protein which has dsRNA decomposition activity, the dsRNA decomposition method and the RNA synthesis method using the protein which has nucleic acid binding activity

<130> T-1882

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1924

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Ser Pro Ala Leu Gln Pro Leu Ser Met Ala Gly Leu Gln Leu 1 5 10 15

Met Thr Pro Ala Ser Ser Pro Met Gly Pro Phe Phe Gly Leu Pro Trp 20 25 30

Gln Gln Glu Ala Ile His Asp Asn Ile Tyr Thr Pro Arg Lys Tyr Gln 35 40 45

Val Glu Leu Leu Glu Ala Ala Leu Asp His Asn Thr Ile Val Cys Leu 50 55 60

Asn Thr Gly Ser Gly Lys Thr Phe Ile Ala Ser Thr Thr Leu Leu Lys 65 70 75 80

Ser Cys Leu Tyr Leu Asp Leu Gly Glu Thr Ser Ala Arg Asn Gly Lys 85 90 95

Arg Thr Val Phe Leu Val Asn Ser Ala Asn Gln Val Ala Gln Gln Val 100 105 110



Ser Ala Val Arg Thr His Ser Asp Leu Lys Val Gly Glu Tyr Ser Asn 115 120 125

Leu Glu Val Asn Ala Ser Trp Thr Lys Glu Arg Trp Asn Gln Glu Phe 130 135 140

Thr Lys His Gln Val Leu Ile Met Thr Cys Tyr Val Ala Leu Asn Val 145 150 155 160

Leu Lys Asn Gly Tyr Leu Ser Leu Ser Asp Ile Asn Leu Leu Val Phe 165 170 175

Asp Glu Cys His Leu Ala Ile Leu Asp His Pro Tyr Arg Glu Phe Met 180 185 190

Lys Leu Cys Glu Ile Cys Pro Ser Cys Pro Arg Ile Leu Gly Leu Thr 195 200 205

Ala Ser Ile Leu Asn Gly Lys Trp Asp Pro Glu Asp Leu Glu Glu Lys 210 215 220

Phe Gln Lys Leu Glu Lys Ile Leu Lys Ser Asn Ala Glu Thr Ala Thr 225 230 235 240

Asp Leu Val Val Leu Asp Arg Tyr Thr Ser Gln Pro Cys Glu Ile Val 245 250 255

Val Asp Cys Gly Pro Phe Thr Asp Arg Ser Gly Leu Tyr Glu Arg Leu 260 265 270

Leu Met Glu Leu Glu Glu Ala Leu Asn Phe Ile Asn Asp Cys Asn Ile 275 280 285

Ser Val His Ser Lys Glu Arg Asp Ser Thr Leu Ile Ser Lys Gln Ile 290 295 300

Leu Ser Asp Cys Arg Ala Val Leu Val Val Leu Gly Pro Trp Cys Ala 305 310 315 320

Asp Lys Val Ala Gly Met Met Val Arg Glu Leu Gln Lys Tyr Ile Lys His Glu Glu Glu Leu His Arg Lys Phe Leu Leu Phe Thr Asp Thr

Phe Leu Arg Lys Ile His Ala Leu Cys Glu Glu His Phe Ser Pro Ala

Ser Leu Asp Leu Lys Phe Val Thr Pro Lys Val Ile Lys Leu Leu Glu

Ile Leu Arg Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Arg His Ser Phe Glu Ser Val

Glu Trp Tyr Asn Asn Arg Asn Gln Asp Asn Tyr Val Ser Trp Ser Asp

Ser Glu Asp Asp Glu Asp Glu Glu Ile Glu Glu Lys Glu Lys Pro

Glu Thr Asn Phe Pro Ser Pro Phe Thr Asn Ile Leu Cys Gly Ile Ile

Phe Val Glu Arg Arg Tyr Thr Ala Val Val Leu Asn Arg Leu Ile Lys

Glu Ala Gly Lys Gln Asp Pro Glu Leu Ala Tyr Ile Ser Ser Asn Phe

Ile Thr Gly His Gly Ile Gly Lys Asn Gln Pro Arg Asn Asn Thr Met

Glu Ala Glu Phe Arg Lys Gln Glu Glu Val Leu Arg Lys Phe Arg Ala



His Glu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Thr Ser Ile Val Glu Glu Gly Val

Asp Ile Pro Lys Cys Asn Leu Val Val Arg Phe Asp Leu Pro Thr Glu

Tyr Arg Ser Tyr Val Gln Ser Lys Gly Arg Ala Arg Ala Pro Ile Ser

Asn Tyr Ile Met Leu Ala Asp Thr Asp Lys Ile Lys Ser Phe Glu Glu

Asp Leu Lys Thr Tyr Lys Ala Ile Glu Lys Ile Leu Arg Asn Lys Cys

Ser Lys Ser Val Asp Thr Gly Glu Thr Asp Ile Asp Pro Val Met Asp

Asp Asp His Val Phe Pro Pro Tyr Val Leu Arg Pro Asp Asp Gly Gly

Pro Arg Val Thr Ile Asn Thr Ala Ile Gly His Ile Asn Arg Tyr Cys

Ala Arg Leu Pro Ser Asp Pro Phe Thr His Leu Ala Pro Lys Cys Arg

Thr Arg Glu Leu Pro Asp Gly Thr Phe Tyr Ser Thr Leu Tyr Leu Pro

Ile Asn Ser Pro Leu Arg Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys

Val Arg Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu

His Lys Ile Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu

Thr Val Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr 725 730 735

Ser Val Pro Gly Arg Pro Gly Ser Thr Lys Arg Arg Gln Cys Tyr Pro 740 745 750

Lys Ala Ile Pro Glu Cys Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln 755 760 765

Pro Cys Tyr Leu Tyr Val Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro 770 775 780

Asp Glu Leu Asn Phe Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr 785 790 795 800

Thr Arg Cys Phe Gly Ile Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro 805 810 815

His Phe Pro Val Tyr Thr Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu 820 825 830

Leu Lys Lys Ser Gly Phe Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile 835 840 845

Thr Arg Leu His Gln Tyr Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys 850 855 860

Pro Ala Leu Glu Phe Lys Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val 865 870 875 880

Leu Pro Leu Asn Val Val Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe 885 890 895

Lys Phe Met Glu Asp Ile Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro 900 905 910

Ser Thr Lys Tyr Thr Lys Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp 915 920 925

Tyr Gln Asp Ala Val Ile Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro 930 935 940

His Arg Phe Tyr Val Ala Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser 945 950 955 960

Lys Phe Pro Ser Pro Glu Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr 965 970 975

Lys Tyr Asn Leu Asp Leu Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val 980 985 990

Asp His Thr Ser Ser Arg Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn 995 1000 1005

Gln Lys Gly Lys Ala Leu Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys 1010 1015 1020

Ala Lys Trp Glu Ser Leu Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu 1025 1030 1035

Leu Cys Ala Ile His Pro Ile Pro Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala 1040 1045 1050

Val Cys Leu Pro Ser Ile Leu Tyr Arg Leu His Cys Leu Leu Thr 1055 1060 1065

Ala Glu Glu Leu Arg Ala Gln Thr Ala Ser Asp Ala Gly Val Gly 1070 1075 1080

Val Arg Ser Leu Pro Ala Asp Phe Arg Tyr Pro Asn Leu Asp Phe 1085 1090 1095

Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp Ser Lys Ser Phe Ile Ser Ile Ser 1100 1105 1110

- Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp Asn Tyr Cys Lys His Ser Thr 1115 1120 1125
- Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln Gly Ala Asn Arg Thr Ser 1130 1135 1140
- Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val Asn Cys Arg Thr Leu 1145 1150 1155
- Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu Val Ser Ala Asp 1160 1165 1170
- Leu Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn Leu Ala Asn 1175 1180 1185
- Gly Ser Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly Asn Gln 1190 1195 1200
- Leu Asn Tyr Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr Ser 1205 1210 1215
- Tyr Ser Ile Gln Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro 1220 1225 1230
- Ser Asp Glu Cys Thr Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn 1235 1240 1245
- Ala Asn Lys Ser Thr Ser Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met 1250 1260
- Pro Gly Thr Thr Asp Thr Ile Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp 1265 1270 1275
- Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly 1280 1285 1290

- Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala 1295 1300 1305
 - Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser 1310 1315 1320
 - Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro 1325 1330 1335
 - Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val 1340 1345 1350
 - Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro 1355 1360 1365
 - Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp Leu 1370 1375 1380
 - Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys 1385 1390 1395
 - Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly 1400 1405 1410
 - Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser 1415 1420 1425
 - Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp 1430 1435 1440
 - Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met 1445 1450 1455
 - Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro 1460 1465 1470
 - Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys 1475 1480 1485

- Ser Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe 1490 1495 1500
- Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys 1505 1510 1515
- Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser 1520 1525 1530
- Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr 1535 1540 1545
- Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp 1550 1560
- Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu 1565 1570 1575
- Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu 1580 1585 1590
- Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr 1595 1600 1605
- Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser Cys 1610 1615 1620
- Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp 1625 1630 1635
- Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp 1640 1645 1650
- His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe 1655 1660 1665

- Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala 1670 1675 1680
- Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr 1685 1690 1695
- Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile 1700 1705 1710
- Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln 1715 1720 1725
- His Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn 1730 1735 1740
- Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys 1745 1750 1755
- Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp 1760 1765 1770
- Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp 1775 1780 1785
- Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp 1790 1795 1800
- Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala 1805 1810 1815
- Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp 1820 1825 1830
- Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser 1835 1840 1845
- Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met Glu 1850 1855 1860

Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly 1865 1870 1875

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys 1880 1885 1890

Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Arg 1895 1900 1905

Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn 1910 1915 1920

Ser

<210> 2

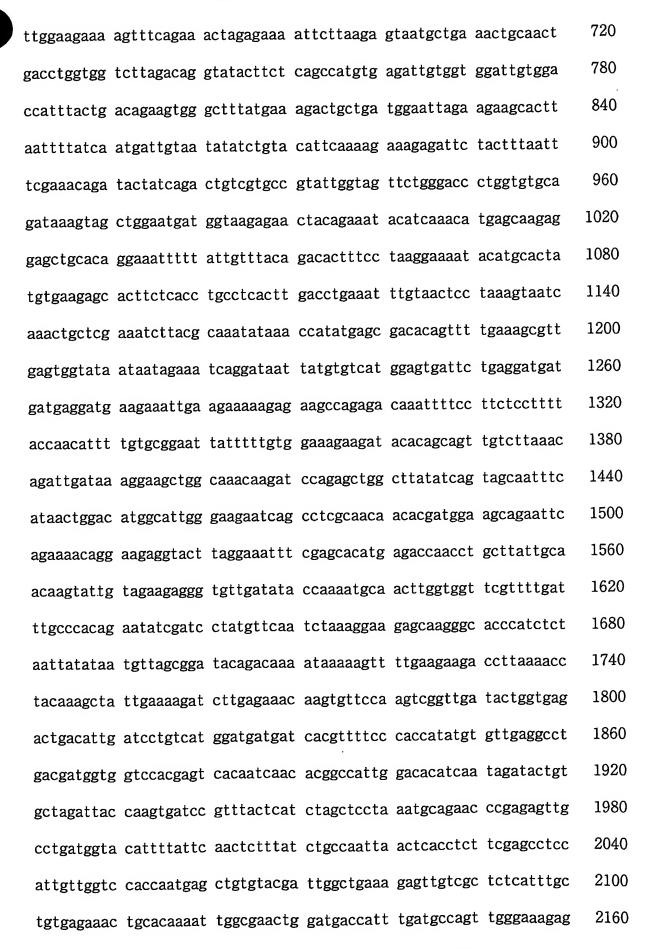
<211> 5772

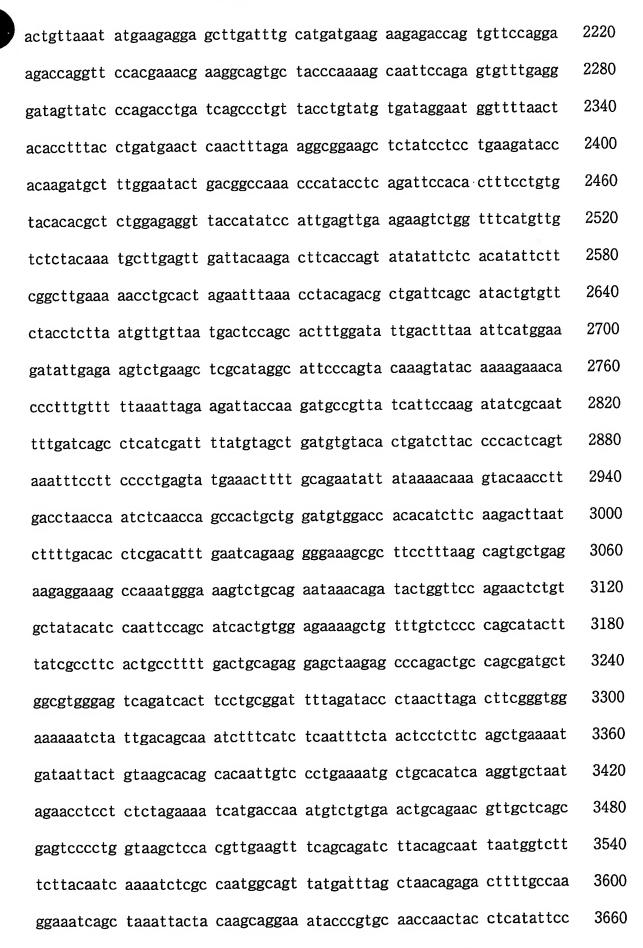
<212> DNA

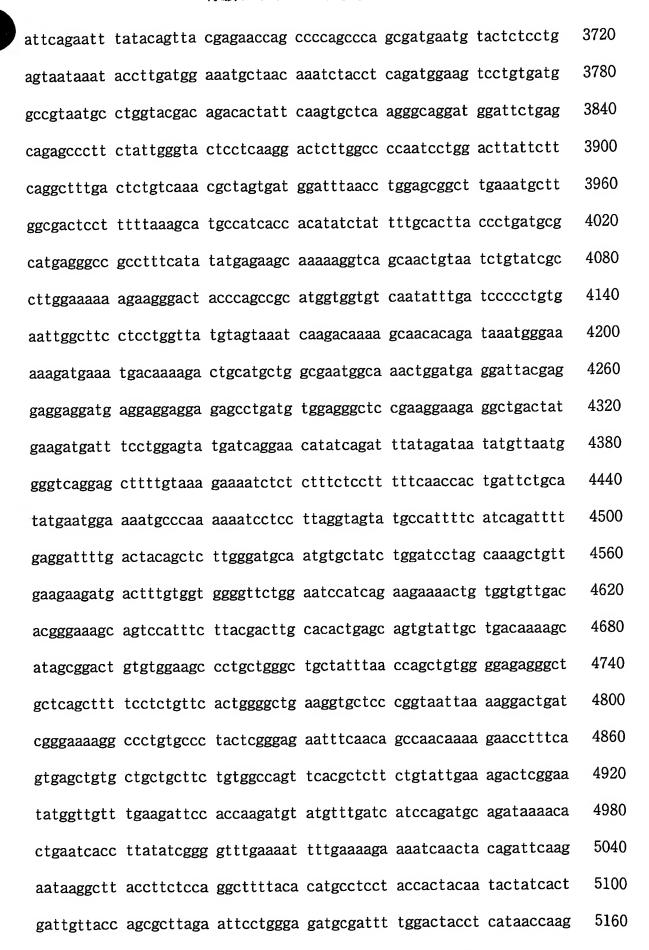
<213> Homo sapiens

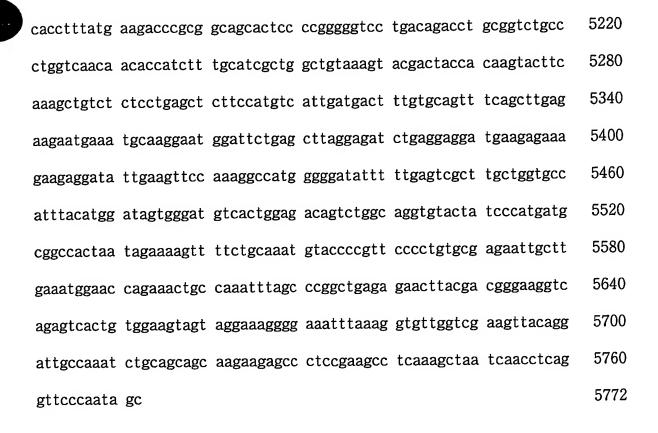
<400> 2

60 atgaaaagcc ctgctttgca acccctcagc atggcaggcc tgcagctcat gacccctgct 120 tcctcaccaa tgggtccttt ctttggactg ccatggcaac aagaagcaat tcatgataac atttatacgc caagaaaata tcaggttgaa ctgcttgaag cagctctgga tcataatacc 180 240 atcgtctgtt taaacactgg ctcagggaag acatttattg ctagtactac tctactaaag agctgtctct atctagatct aggggagact tcagctagaa atggaaaaag gacggtgttc 300 360 ttggtcaact ctgcaaacca ggttgctcaa caagtgtcag ctgtcagaac tcattcagat 420 ctcaaggttg gggaatactc aaacctagaa gtaaatgcat cttggacaaa agagagatgg 480 aaccaagagt ttactaagca ccaggttctc attatgactt gctatgtcgc cttgaatgtt ttgaaaaatg gttacttatc actgtcagac attaaccttt tggtgtttga tgagtgtcat 540 cttgcaatcc tagaccaccc ctatcgagaa tttatgaagc tctgtgaaat ttgtccatca 600 660 tgtcctcgca ttttgggact aactgcttcc attttaaatg ggaaatggga tccagaggat









<210> 3

<211> 1962

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 3

60 caagtgctca agggcaggat ggattctgag cagagccctt ctattgggta ctcctcaagg 120 actcttggcc ccaatcctgg acttattctt caggctttga ctctgtcaaa cgctagtgat 180 ggatttaacc tggagcggct tgaaatgctt ggcgactcct ttttaaagca tgccatcacc 240 acatatctat tttgcactta ccctgatgcg catgagggcc gcctttcata tatgagaagc 300 aaaaaggtca gcaactgtaa tctgtatcgc cttggaaaaa agaagggact acccagccgc 360 atggtggtgt caatatttga tccccctgtg aattggcttc ctcctggtta tgtagtaaat 420 caagacaaaa gcaacacaga taaatgggaa aaagatgaaa tgacaaaaga ctgcatgctg 480 gcgaatggca aactggatga ggattacgag gaggaggatg aggaggagga gagcctgatg tggagggctc cgaaggaaga ggctgactat gaagatgatt tcctggagta tgatcaggaa 540



600 catatcagat ttatagataa tatgttaatg gggtcaggag cttttgtaaa gaaaatctct 660 ctttctcctt tttcaaccac tgattctgca tatgaatgga aaatgcccaa aaaatcctcc 720 ttaggtagta tgccattttc atcagatttt gaggattttg actacagctc ttggggatgca 780 atgtgctatc tggatcctag caaagctgtt gaagaagatg actttgtggt ggggttctgg 840 aatccatcag aagaaaactg tggtgttgac acgggaaagc agtccatttc ttacgacttg 900 cacactgagc agtgtattgc tgacaaaagc atagcggact gtgtggaagc cctgctgggc 960 tgctatttaa ccagctgtgg ggagagggct gctcagcttt tcctctgttc actggggctg 1020 aaggtgctcc cggtaattaa aaggactgat cgggaaaagg ccctgtgccc tactcgggag 1080 aatttcaaca gccaacaaaa gaacctttca gtgagctgtg ctgctgcttc tgtggccagt 1140 tcacgctctt ctgtattgaa agactcggaa tatggttgtt tgaagattcc accaagatgt 1200 atgtttgatc atccagatgc agataaaaca ctgaatcacc ttatatcggg gtttgaaaat 1260 tttgaaaaga aaatcaacta cagattcaag aataaggctt accttctcca ggcttttaca 1320 catgcctcct accactacaa tactatcact gattgttacc agcgcttaga attcctggga 1380 gatgcgattt tggactacct cataaccaag cacctttatg aagacccgcg gcagcactcc ccgggggtcc tgacagacct gcggtctgcc ctggtcaaca acaccatctt tgcatcgctg 1440 gctgtaaagt acgactacca caagtacttc aaagctgtct ctcctgagct cttccatgtc 1500 attgatgact ttgtgcagtt tcagcttgag aagaatgaaa tgcaaggaat ggattctgag 1560 1620 cttaggagat ctgaggagga tgaagagaaa gaagaggata ttgaagttcc aaaggccatg 1680 ggggatattt ttgagtcgct tgctggtgcc atttacatgg atagtgggat gtcactggag 1740 acagtctggc aggtgtacta tcccatgatg cggccactaa tagaaaagtt ttctgcaaat 1800 gtaccccgtt cccctgtgcg agaattgctt gaaatggaac cagaaactgc caaatttagc 1860 ccggctgaga gaacttacga cgggaaggtc agagtcactg tggaagtagt aggaaagggg 1920 aaatttaaag gtgttggtcg aagttacagg attgccaaat ctgcagcagc aagaagagcc 1962 ctccgaagcc tcaaagctaa tcaacctcag gttcccaata gc

- <211> 654 <212> PRT
 - <213> Artificial sequence

<220>

An amino acid sequence of human dicer mutant. <223>

<400> 4

Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly 15 10 5

Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala 30 20

Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu 45 40 35

Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe 55 60 50

Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser 80 70 65

Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Gly 95 90 85

Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp 110 105 100

Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys 125 120 115

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly Lys 140 135 130

Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ser Leu Met 160 155 150 145

Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp Phe Leu Glu

165

170

175

Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met Leu Met Gly Ser 180 185 190

Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro Phe Ser Thr Thr Asp 195 200 205

Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser Ser Leu Gly Ser Met 210 215 220

Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala 225 230 235 240

Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val 245 250 255

Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly 260 265 270

Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp 275 280 285

Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr 290 295 300

Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu 305 310 315 320

Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys 325 330 335

Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser 340 345 350

Cys Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp 355 360 365 Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp His 370 375 380

Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe Glu Asn 385 390 395 400

Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala Tyr Leu Leu 405 410 415

Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr Ile Thr Asp Cys 420 425 430

Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile Leu Asp Tyr Leu Ile 435 440 445

Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His Ser Pro Gly Val Leu 450 455 460

Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu 465 470 475 480

Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu 485 490 495

Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn 500 505 510

Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu 515 520 525

Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe 530 535 540

Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu 545 550 555 560

Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys 出証特2004-3085963

ページ: 20/

565 570 575

Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met 580 585 590

Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly 595 600 605

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys Gly 610 615 620

Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg Arg Ala 625 630 635 640

Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn Ser 645 650

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 1 to amplfy a gene encoding human dicer

<400> 5

tcgagctcgg taccccaagt gctcaagggc aggatg

36

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 2 to amplfy a gene encoding human dicer

<400> 6

tatctagaaa gcttttagct attgggaacc tgaggt

36

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

•		
1		

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 3 to amplfy a gene encoding red-shifted green fluorescen ce protein

<400> 7

gggtaatacg actcactata gggagaatgg ctagcaaagg ag

42

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 4 to amplfy a gene encoding red-shifted green fluorescen ce protein

<400> 8

gggtaatacg actcactata gggagatcag ttgtacagtt ca

42

<210> 9

<211> 66

<212> PRT

<213> Thermotoga maritima

<400> 9

Met Arg Gly Lys Val Lys Trp Phe Asp Ser Lys Lys Gly Tyr Gly Phe 1 5 10 15

Ile Thr Lys Asp Glu Gly Gly Asp Val Phe Val His Trp Ser Ala Ile 20. 25 30

Glu Met Glu Gly Phe Lys Thr Leu Lys Glu Gly Gln Val Val Glu Phe 35 40 45

Glu Ile Gln Glu Gly Lys Lys Gly Pro Gln Ala Ala His Val Lys Val 50 55 60

Val Glu

65

<210> 10 <211> 198 <212> DNA <213> Thermotoga maritima	
<400> 10 atgagaggaa aggttaagtg gttcgattcc aagaagggct acggattcat cacaaaggac	60
gaaggaggag acgtgttcgt acactggtca gccatcgaaa tggaaggttt caaaactctg	120
aaggaaggcc aggtcgtcga gttcgagatt caggaaggca agaaaggtcc acaggcagcg	180
cacgtgaaag tagttgag	198
<210> 11 <211> 720 <212> DNA <213> Artificial sequence <220> <223> A gene encoding red-shifted green fluorescence protein.	
<400> 11 atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat	60
ggtgatgtta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgcaacatac	120
ggaaaactta ccctgaagtt catctgcact actggcaaac tgcctgttcc atggccaaca	180
ctagtcacta ctctgtgcta tggtgttcaa tgcttttcaa gatacccgga tcatatgaaa	240
cggcatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc	300
ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt	360
gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggaaacat tctgggacac	420
aaattggaat acaactataa ctcacacaat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat	480
ggaatcaaag tgaacttcaa gacccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca	540
gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaaccat	600
tacctgtcca cacaatctgc cctttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc	660

cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaactga

720

- <211> 675 <212> PRT
 - <213> Artificial sequence

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 12

Met Asn His Lys Val His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn 1 5 10 15

Ser Ser Ser Val Pro Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln 20 25 30

Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly 35 40 45

Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn 50 55 60

Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile 65 70 75 80

Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu 85 90 95

Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu 100 105 110

Gly Lys Lys Gly Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp 115 120 125

Pro Pro Val Asn Trp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys 130 135 140

Ser Asn Thr Asp Lys Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met 145 150 155 160

Leu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Glu Glu

165

170

175

Glu Glu Ser Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu 180 185 190

Asp Asp Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn 195 200 205

Met Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro 210 215 220

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser 225 230 235 240

Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr 245 250 255

Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu 260 265 270

Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys 275 280 285

Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu 290 295 300

Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu 305 310 315 320

Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu 325 330 335

Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg 340 345 350

Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys 355 360 365

Asn Leu Ser Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser 370 375 380

Ser Val Leu Lys Asp Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg 385 390 395 400

Cys Met Phe Asp His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile 405 410 415

Ser Gly Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn 420 425 430

Lys Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn 435 440 445

Thr Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile 450 455 460

Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His 465 470 475 480

Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr 485 490 495

Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys 500 505 510

Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe 515 520 525

Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg 530 535 540

Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala 545 550 555 560

Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser



565 570 575

Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg 580 585 590

Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg 595 600 605

Glu Leu Leu Glu Met Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu 610 615 620

Arg Thr Tyr Asp Gly Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys 625 630 635 640

Gly Lys Phe Lys Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala 645 650 655

Ala Ala Arg Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val 660 665 670

Pro Asn Ser 675

<210> 13

<211> 2025

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 13

atgaatcaca aagtgcatca tcatcatcat catatcgaag gtaggaattc gagctcggta 60 ccccaagtgc tcaagggcag gatggattct gagcagagcc cttctattgg gtactcctca 120 aggactcttg gccccaatcc tggacttatt cttcaggctt tgactctgtc aaacgctagt 180 gatggattta acctggagcg gcttgaaatg cttggcgact cctttttaaa gcatgccatc 240 accacatatc tattttgcac ttaccctgat gcgcatgagg gccgcctttc atatatgaga 300

360 agcaaaaagg tcagcaactg taatctgtat cgccttggaa aaaagaaggg actacccagc 420 cgcatggtgg tgtcaatatt tgatcccct gtgaattggc ttcctcctgg ttatgtagta 480 aatcaagaca aaagcaacac agataaatgg gaaaaagatg aaatgacaaa agactgcatg 540 ctggcgaatg gcaaactgga tgaggattac gaggaggagg atgaggagga ggagagcctg 600 atgtggaggg ctccgaagga agaggctgac tatgaagatg atttcctgga gtatgatcag 660 gaacatatca gatttataga taatatgtta atggggtcag gagcttttgt aaagaaaatc 720 tctctttctc ctttttcaac cactgattct gcatatgaat ggaaaatgcc caaaaaatcc 780 tccttaggta gtatgccatt ttcatcagat tttgaggatt ttgactacag ctcttgggat 840 gcaatgtgct atctggatcc tagcaaagct gttgaagaag atgactttgt ggtggggttc 900 tggaatccat cagaagaaaa ctgtggtgtt gacacgggaa agcagtccat ttcttacgac 960 ttgcacactg agcagtgtat tgctgacaaa agcatagcgg actgtgtgga agccctgctg ggctgctatt taaccagctg tggggagagg gctgctcagc ttttcctctg ttcactgggg 1020 1080 ctgaaggtgc tcccggtaat taaaaggact gatcgggaaa aggccctgtg ccctactcgg 1140 gagaatttca acagccaaca aaagaacctt tcagtgagct gtgctgctgc ttctgtggcc 1200 agttcacgct cttctgtatt gaaagactcg gaatatggtt gtttgaagat tccaccaaga 1260 tgtatgtttg atcatccaga tgcagataaa acactgaatc accttatatc ggggtttgaa 1320 aattttgaaa agaaaatcaa ctacagattc aagaataagg cttaccttct ccaggctttt 1380 acacatgcct cctaccacta caatactatc actgattgtt accagcgctt agaattcctg 1440 ggagatgcga ttttggacta cctcataacc aagcaccttt atgaagaccc gcggcagcac tccccggggg tcctgacaga cctgcggtct gccctggtca acaacaccat ctttgcatcg 1500 1560 ctggctgtaa agtacgacta ccacaagtac ttcaaagctg tctctcctga gctcttccat 1620 gtcattgatg actttgtgca gtttcagctt gagaagaatg aaatgcaagg aatggattct 1680 gagcttagga gatctgagga ggatgaagag aaagaagagg atattgaagt tccaaaggcc 1740 atgggggata tttttgagtc gcttgctggt gccatttaca tggatagtgg gatgtcactg gagacagtct ggcaggtgta ctatcccatg atgcggccac taatagaaaa gttttctgca 1800

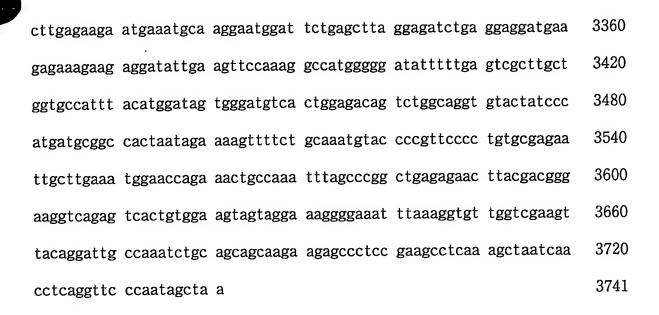
出証特2004-3085963

aatgtacccc gttcccctgt gcgagaattg cttgaaatgg aaccagaaac tgccaaattt	1860
agcccggctg agagaactta cgacgggaag gtcagagtca ctgtggaagt agtaggaaag	1920
gggaaattta aaggtgttgg tcgaagttac aggattgcca aatctgcagc agcaagaaga	1980
gccctccgaa gcctcaaagc taatcaacct caggttccca atagc	2025
<210> 14 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Synthetic primer 5 to amplify a gene encoding human dicer m	utant
<400> 14 tcgagctcgg tacccgcctc cattgttggt ccacca	36
<210> 15 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Synthetic primer 6 to amplify a gene encoding human dicer n	nutant
<400> 15 tatctagaaa gcttttagct attgggaacc tgaggt	36
<210> 16 <211> 3741 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> A gene encoding human dicer mutant	
<400> 16 gcctccattg ttggtccacc aatgagctgt gtacgattgg ctgaaagagt tgtcgctctc	60
atttgctgtg agaaactgca caaaattggc gaactggatg accatttgat gccagttggg	120
aaagagactg ttaaatatga agaggagctt gatttgcatg atgaagaaga gaccagtgtt	180
ccaggaagac caggttccac gaaacgaagg cagtgctacc caaaagcaat tccagagtgt	240
ttgagggata gttatcccag acctgatcag ccctgttacc tgtatgtgat aggaatggtt	300



360 ttaactacac ctttacctga tgaactcaac tttagaaggc ggaagctcta tcctcctgaa 420 gataccacaa gatgctttgg aatactgacg gccaaaccca tacctcagat tccacacttt 480 cctgtgtaca cacgctctgg agaggttacc atatccattg agttgaagaa gtctggtttc 540 atgttgtctc tacaaatgct tgagttgatt acaagacttc accagtatat attctcacat 600 attcttcggc ttgaaaaacc tgcactagaa tttaaaccta cagacgctga ttcagcatac 660 tgtgttctac ctcttaatgt tgttaatgac tccagcactt tggatattga ctttaaattc 720 atggaagata ttgagaagtc tgaagctcgc ataggcattc ccagtacaaa gtatacaaaa 780 gaaacaccct ttgtttttaa attagaagat taccaagatg ccgttatcat tccaagatat cgcaattttg atcagcctca tcgattttat gtagctgatg tgtacactga tcttacccca 840 900 ctcagtaaat ttccttcccc tgagtatgaa acttttgcag aatattataa aacaaagtac 960 aaccttgacc taaccaatct caaccagcca ctgctggatg tggaccacac atcttcaaga 1020 cttaatcttt tgacacctcg acatttgaat cagaagggga aagcgcttcc tttaagcagt 1080 gctgagaaga ggaaagccaa atgggaaagt ctgcagaata aacagatact ggttccagaa ctctgtgcta tacatccaat tccagcatca ctgtggagaa aagctgtttg tctccccagc 1140 1200 atactttatc gccttcactg ccttttgact gcagaggagc taagagccca gactgccagc gatgctggcg tgggagtcag atcacttcct gcggatttta gataccctaa cttagacttc 1260 gggtggaaaa aatctattga cagcaaatct ttcatctcaa tttctaactc ctcttcagct 1320 1380 gaaaatgata attactgtaa gcacagcaca attgtccctg aaaatgctgc acatcaaggt gctaatagaa cctcctctct agaaaatcat gaccaaatgt ctgtgaactg cagaacgttg 1440 1500 ctcagcgagt cccctggtaa gctccacgtt gaagtttcag cagatcttac agcaattaat 1560 ggtctttctt acaatcaaaa tctcgccaat ggcagttatg atttagctaa cagagacttt tgccaaggaa atcagctaaa ttactacaag caggaaatac ccgtgcaacc aactacctca 1620 tattccattc agaatttata cagttacgag aaccagccc agcccagcga tgaatgtact 1680 ctcctgagta ataaatacct tgatggaaat gctaacaaat ctacctcaga tggaagtcct 1740 gtgatggccg taatgcctgg tacgacagac actattcaag tgctcaaggg caggatggat 1800

tctgagcaga gcccttctat tgggtactcc tcaaggactc ttggccccaa tcctggactt	1860
attcttcagg ctttgactct gtcaaacgct agtgatggat ttaacctgga gcggcttgaa	1920
atgcttggcg actccttttt aaagcatgcc atcaccacat atctattttg cacttaccct	1980
gatgcgcatg agggccgcct ttcatatatg agaagcaaaa aggtcagcaa ctgtaatctg	2040
tatcgccttg gaaaaaagaa gggactaccc agccgcatgg tggtgtcaat atttgatccc	2100
cctgtgaatt ggcttcctcc tggttatgta gtaaatcaag acaaaagcaa cacagataaa	2160
tgggaaaaag atgaaatgac aaaagactgc atgctggcga atggcaaact ggatgaggat	2220
tacgaggagg aggatgagga ggaggagagc ctgatgtgga gggctccgaa ggaagaggct	2280
gactatgaag atgatttcct ggagtatgat caggaacata tcagatttat agataatatg	2340
ttaatggggt caggagcttt tgtaaagaaa atctctcttt ctccttttc aaccactgat	2400
tctgcatatg aatggaaaat gcccaaaaaa tcctccttag gtagtatgcc attttcatca	2460
gattttgagg attttgacta cagctcttgg gatgcaatgt gctatctgga tcctagcaaa	2520
gctgttgaag aagatgactt tgtggtgggg ttctggaatc catcagaaga aaactgtggt	2580
gttgacacgg gaaagcagtc catttcttac gacttgcaca ctgagcagtg tattgctgac	2640
aaaagcatag cggactgtgt ggaagccctg ctgggctgct atttaaccag ctgtggggag	2700
agggctgctc agcttttcct ctgttcactg gggctgaagg tgctcccggt aattaaaagg	2760
actgatcggg aaaaggccct gtgccctact cgggagaatt tcaacagcca acaaaagaac	2820
ctttcagtga gctgtgctgc tgcttctgtg gccagttcac gctcttctgt attgaaagac	2880
tcggaatatg gttgtttgaa gattccacca agatgtatgt ttgatcatcc agatgcagat	2940
aaaacactga atcaccttat atcggggttt gaaaattttg aaaagaaaat caactacaga	3000
ttcaagaata aggettaeet tetecagget tttacacatg eeteetaeea etacaataet	3060
atcactgatt gttaccagcg cttagaattc ctgggagatg cgattttgga ctacctcata	3120
accaagcacc tttatgaaga cccgcggcag cactccccgg gggtcctgac agacctgcgg	3180
tctgccctgg tcaacaacac catctttgca tcgctggctg taaagtacga ctaccacaag	3240
tacttcaaag ctgtctctcc tgagctcttc catgtcattg atgactttgt gcagtttcag	3300



<210> 17

<211> 1246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 17

Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys Val Arg Leu Ala Glu Arg 1 5 10 15

Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu His Lys Ile Gly Glu Leu 20 25 30

Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu Thr Val Lys Tyr Glu Glu 35 40 45

Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr Ser Val Pro Gly Arg Pro 50 55 60

Gly Ser Thr Lys Arg Gln Cys Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Glu Cys 65 70 75 80

Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln Pro Cys Tyr Leu Tyr Val 85 90 95



Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro Asp Glu Leu Asn Phe Arg 100 105 110

Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr Thr Arg Cys Phe Gly Ile 115 120 125

Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro His Phe Pro Val Tyr Thr 130 135 140

Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu Leu Lys Lys Ser Gly Phe 145 150 155 160

Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile Thr Arg Leu His Gln Tyr 165 170 175

Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys Pro Ala Leu Glu Phe Lys 180 185 190

Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val Leu Pro Leu Asn Val Val 195 200 205

Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe Lys Phe Met Glu Asp Ile 210 215 220

Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro Ser Thr Lys Tyr Thr Lys 225 230 235 240

Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp Tyr Gln Asp Ala Val Ile 245 250 255

Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro His Arg Phe Tyr Val Ala 260 265 270

Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser Lys Phe Pro Ser Pro Glu 275 280 285

33/



Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr Lys Tyr Asn Leu Asp Leu 290 295 300

Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val Asp His Thr Ser Ser Arg 305 310 315 320

Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn Gln Lys Gly Lys Ala Leu 325 330 335

Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys Ala Lys Trp Glu Ser Leu Gln 340 345 350

Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu Leu Cys Ala Ile His Pro Ile Pro 355 360 365

Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala Val Cys Leu Pro Ser Ile Leu Tyr Arg 370 375 380

Leu His Cys Leu Leu Thr Ala Glu Glu Leu Arg Ala Gln Thr Ala Ser 385 390 395 400

Asp Ala Gly Val Gly Val Arg Ser Leu Pro Ala Asp Phe Arg Tyr Pro 405 410 415

Asn Leu Asp Phe Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp Ser Lys Ser Phe Ile 420 425 430

Ser Ile Ser Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp Asn Tyr Cys Lys His 435 440 445

Ser Thr Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln Gly Ala Asn Arg Thr 450 455 460

Ser Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val Asn Cys Arg Thr Leu 465 470 475 480

Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu Val Ser Ala Asp Leu 485 490 495

Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn Leu Ala Asn Gly Ser 500 505 510

Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly Asn Gln Leu Asn Tyr 515 520 525

Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr Ser Tyr Ser Ile Gln 530 535 540

Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro Ser Asp Glu Cys Thr 545 550 555 560

Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn Ala Asn Lys Ser Thr Ser 565 570 575

Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met Pro Gly Thr Thr Asp Thr Ile 580 585 590

Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly 595 600 605

Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala 610 615 620

Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu 625 630 635 640

Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe 645 650 655

Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser 660 665 670

Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Gly 675 680 685



Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp 690 695 700

Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys 705 710 715 720

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly Lys 725 730 735

Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Met 740 745 750

Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp Phe Leu Glu 755 760 765

Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met Leu Met Gly Ser 770 775 780

Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro Phe Ser Thr Thr Asp 785 790 795 800

Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser Ser Leu Gly Ser Met 805 810 815

Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala 820 825 830

Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val 835 840 845

Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly 850 855 860

Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp 865 870 875 880

Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr 885 890 895

- Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu 900 905 910
- Lys Val Leu Pro Val IIe Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys 915 920 925
- Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser 930 935 940
- Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp 945 950 955 960
- Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp His 965 970 975
- Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe Glu Asn 980 985 990
- Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala Tyr Leu Leu 995 1000 1005
- Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr Ile Thr Asp 1010 1015 1020
- Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile Leu Asp Tyr 1025 1030 1035
- Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His Ser Pro 1040 1045 1050
- Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr Ile 1055 1060 1065
- Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys 1070 1075 1080

Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln 1085 1090 1095

Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu 1100 1105 1110

Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val 1115 1120 1125

Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile 1130 1135 1140

Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp Gln Val Tyr 1145 1150 1155

Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser Ala Asn Val 1160 1165 1170

Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met Glu Pro Glu Thr 1175 1180 1185

Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly Lys Val Arg 1190 1195 1200

Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys Gly Val Gly 1205 1210 1215

Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg Arg Ala Leu 1220 1225 1230

Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn Ser 1235 1240 1245

<210> 18

<211> 1267

<212> PRT

<213> Artificial



<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 18

Met Asn His Lys Val His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn 1 5 10 15

Ser Ser Ser Val Pro Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys Val 20 25 30

Arg Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu His 35 40 45

Lys Ile Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu Thr 50 55 60

Val Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr Ser 65 70 75 80

Val Pro Gly Arg Pro Gly Ser Thr Lys Arg Arg Gln Cys Tyr Pro Lys 85 90 95

Ala Ile Pro Glu Cys Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln Pro 100 105 110

Cys Tyr Leu Tyr Val Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro Asp 115 120 125

Glu Leu Asn Phe Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr Thr 130 135 140

Arg Cys Phe Gly Ile Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro His 145 150 155 160

Phe Pro Val Tyr Thr Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu Leu 165 170 175

Lys Lys Ser Gly Phe Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile Thr 180 185 190

Arg Leu His Gln Tyr Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys Pro 195 200 205

Ala Leu Glu Phe Lys Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val Leu 210 215 220

Pro Leu Asn Val Val Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe Lys 225 230 235 240

Phe Met Glu Asp Ile Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro Ser 245 250 255

Thr Lys Tyr Thr Lys Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp Tyr 260 265 270

Gln Asp Ala Val Ile Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro His 275 280 285

Arg Phe Tyr Val Ala Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser Lys 290 295 300

Phe Pro Ser Pro Glu Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr Lys 305 310 315 320

Tyr Asn Leu Asp Leu Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val Asp 325 330 335

His Thr Ser Ser Arg Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn Gln 340 345 350

Lys Gly Lys Ala Leu Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys Ala Lys 355 360 365

Trp Glu Ser Leu Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu Leu Cys Ala 370 375 380



Ile His Pro Ile Pro Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala Val Cys Leu Pro 385 390 395 400

Ser Ile Leu Tyr Arg Leu His Cys Leu Leu Thr Ala Glu Glu Leu Arg 405 410 415

Ala Gln Thr Ala Ser Asp Ala Gly Val Gly Val Arg Ser Leu Pro Ala 420 425 430

Asp Phe Arg Tyr Pro Asn Leu Asp Phe Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp 435 440 445

Ser Lys Ser Phe Ile Ser Ile Ser Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp 450 455 460

Asn Tyr Cys Lys His Ser Thr Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln 465 470 475 480

Gly Ala Asn Arg Thr Ser Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val 485 490 495

Asn Cys Arg Thr Leu Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu 500 505 510

Val Ser Ala Asp Leu Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn 515 520 525

Leu Ala Asn Gly Ser Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly 530 535 540

Asn Gln Leu Asn Tyr Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr 545 550 555 560

Ser Tyr Ser Ile Gln Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro 565 570 575

Ser Asp Glu Cys Thr Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn Ala 580 585 590

Asn Lys Ser Thr Ser Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met Pro Gly 595 600 605

Thr Thr Asp Thr Ile Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln 610 615 620

Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly 625 630 635 640

Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn 645 650 655

Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile 660 665 670

Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu 675 680 685

Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu 690 695 700

Gly Lys Lys Gly Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp 705 710 715 720

Pro Pro Val Asn Trp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys 725 730 735

Ser Asn Thr Asp Lys Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met 740 745 750

Leu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu 755 760 765

Glu Glu Ser Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu 770 775 780



Asp Asp Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn 785 790 795 800

Met Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro 805 810 815

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser 820 825 830

Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr 835 840 845

Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu 850 855 860

Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys 865 870 875 880

Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu 885 890 895

Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu 900 905 910

Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu 915 920 925

Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu Pro Val IIe Lys Arg Thr Asp Arg 930 935 940

Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys 945 950 955 960

Asn Leu Ser Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser 965 970 975

Ser Val Leu Lys Asp Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg 980 985 990

- Cys Met Phe Asp His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile 995 1000 1005
- Ser Gly Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys 1010 1015 1020
- Asn Lys Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His 1025 1030 1035
- Tyr Asn Thr Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly 1040 1045 1050
- Asp Ala Ile Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp 1055 1060 1065
- Pro Arg Gln His Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala 1070 1075 1080
- Leu Val Asn Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp 1085 1090 1095
- Tyr His Lys Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val 1100 1105 1110
- Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln 1115 1120 1125
- Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys 1130 1135 1140
- Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu 1145 1150 1155
- Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu 1160 1165 1170

Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu 1175 1180 1185

Lys Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu 1190 1195 1200

Glu Met Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr 1205 1210 1215

Tyr Asp Gly Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly 1220 1235 1230

Lys Phe Lys Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala 1235 1240 1245

Ala Ala Arg Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln 1250 1260

Val Pro Asn Ser 1265

<210> 19

<211> 3804

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 19

atgaatcaca aagtgcatca tcatcatcat catatcgaag gtaggaattc gagctcggta 60 cccgcctcca ttgttggtcc accaatgagc tgtgtacgat tggctgaaag agttgtcgct 120 ctcatttgct gtgagaaact gcacaaaatt ggcgaactgg atgaccattt gatgccagtt 180 gggaaaggag ctgttaaata tgaagaggag cttgatttgc atgatgaaga agagaccagt 240 gttccaggaa gaccaggttc cacgaaacga aggcagtgct acccaaaagc aattccagag 300 tgtttgaggg atagttatcc cagacctgat cagccctgtt acctgtatgt gataggaatg 360 gttttaacta cacctttacc tgatgaactc aactttagaa ggcggaagct ctatcctct 420

gaagatacca caagat	gctt tggaatactg a	acggccaaac	ccatacctca	gattccacac	480
tttcctgtgt acacac	gctc tggagaggtt a	accatatcca	ttgagttgaa	gaagtctggt	540
ttcatgttgt ctctac	aaat gcttgagttg a	attacaagac	ttcaccagta	tatattctca	600
catattcttc ggcttg	aaaa acctgcacta g	gaatttaaac	ctacagacgc	tgattcagca	660
tactgtgttc tacctc	ttaa tgttgttaat į	gactccagca	ctttggatat	tgactttaaa	720
ttcatggaag atattg	agaa gtctgaagct (cgcataggca	ttcccagtac	aaagtataca	780
aaagaaacac cctttg	tttt taaattagaa ;	gattaccaag	atgccgttat	cattccaaga	840
tatcgcaatt ttgatc	agcc tcatcgattt	tatgtagctg	atgtgtacac	tgatcttacc	900
ccactcagta aatttc	cttc ccctgagtat	gaaacttttg	cagaatatta	taaaacaaag	960
tacaaccttg acctaa	ccaa tctcaaccag	ccactgctgg	atgtggacca	cacatcttca	1020
agacttaatc ttttga	cacc tcgacatttg	aatcagaagg	ggaaagcgct	tcctttaagc	1080
agtgctgaga agagga	aagc caaatgggaa	agtctgcaga	ataaacagat	actggttcca	1140
gaactctgtg ctatac	catcc aattccagca	tcactgtgga	gaaaagctgt	ttgtctcccc	1200
agcatacttt atcgcc	ttca ctgccttttg	actgcagagg	agctaagagc	ccagactgcc	1260
agcgatgctg gcgtgg	ggagt cagatcactt	cctgcggatt	ttagataccc	taacttagac	1320
ttcgggtgga aaaaat	ctat tgacagcaaa	tctttcatct	caatttctaa	ctcctcttca	1380
gctgaaaatg ataatt	tactg taagcacagc	acaattgtcc	ctgaaaatgc	tgcacatcaa	1440
ggtgctaata gaacct	tcctc tctagaaaat	catgaccaaa	tgtctgtgaa	ctgcagaacg	1500
ttgctcagcg agtcc	cctgg taagctccac	gttgaagttt	cagcagatct	tacagcaatt	1560
aatggtcttt cttaca	aatca aaatctcgcc	aatggcagtt	atgatttagc	taacagagac	1620
ttttgccaag gaaato	cagct aaattactac	aagcaggaaa	tacccgtgca	accaactacc	1680
tcatattcca ttcaga	aattt atacagttac	gagaaccagc	cccagcccag	cgatgaatgt	1740
actctcctga gtaata	aaata ccttgatgga	aatgctaaca	aatctacctc	agatggaagt	1800
cctgtgatgg ccgta	atgcc tggtacgaca	gacactattc	aagtgctcaa	gggcaggatg	1860
gattctgagc agagco	ccttc tattgggtac	tcctcaagga	ctcttggccc	caatcctgga	1920

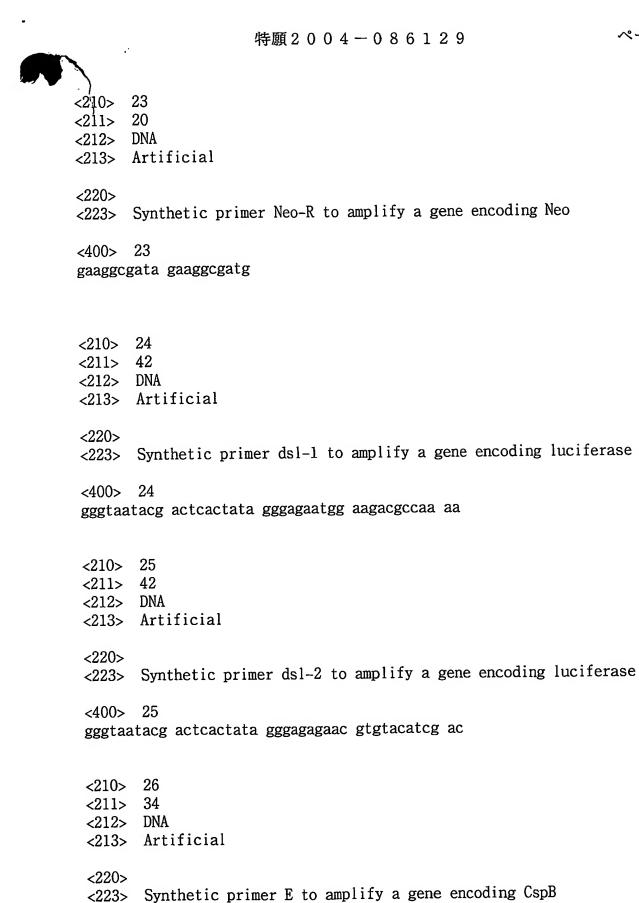
1980 citattette aggetttgae tetgteaaac getagtgatg gatttaacet ggageggett 2040 gaaatgcttg gcgactcctt tttaaagcat gccatcacca catatctatt ttgcacttac 2100 cctgatgcgc atgagggccg cctttcatat atgagaagca aaaaggtcag caactgtaat ctgtatcgcc ttggaaaaaa gaagggacta cccagccgca tggtggtgtc aatatttgat 2160 2220 cccctgtga attggcttcc tcctggttat gtagtaaatc aagacaaaag caacacagat 2280 aaatgggaaa aagatgaaat gacaaaagac tgcatgctgg cgaatggcaa actggatgag 2340 gattacgagg aggaggatga ggaggaggag agcctgatgt ggagggctcc gaaggaagag 2400 gctgactatg aagatgattt cctggagtat gatcaggaac atatcagatt tatagataat 2460 atgttaatgg ggtcaggagc ttttgtaaag aaaatctctc tttctccttt ttcaaccact gattctgcat atgaatggaa aatgcccaaa aaatcctcct taggtagtat gccattttca 2520 2580 tcagattttg aggattttga ctacagctct tgggatgcaa tgtgctatct ggatcctagc 2640 aaagctgttg aagaagatga ctttgtggtg gggttctgga atccatcaga agaaaactgt ggtgttgaca cgggaaagca gtccatttct tacgacttgc acactgagca gtgtattgct 2700 2760 gacaaaagca tagcggactg tgtggaagcc ctgctgggct gctatttaac cagctgtggg 2820 gagagggctg ctcagctttt cctctgttca ctggggctga aggtgctccc ggtaattaaa 2880 aggactgatc gggaaaaggc cctgtgccct actcgggaga atttcaacag ccaacaaaag 2940 aacctttcag tgagctgtgc tgctgcttct gtggccagtt cacgctcttc tgtattgaaa gactcggaat atggttgttt gaagattcca ccaagatgta tgtttgatca tccagatgca 3000 gataaaacac tgaatcacct tatatcgggg tttgaaaatt ttgaaaagaa aatcaactac 3060 3120 agattcaaga ataaggctta ccttctccag gcttttacac atgcctccta ccactacaat actatcactg attgttacca gcgcttagaa ttcctgggag atgcgatttt ggactacctc 3180 ataaccaagc acctttatga agacccgcgg cagcactccc cggggggtcct gacagacctg 3240 cggtctgccc tggtcaacaa caccatcttt gcatcgctgg ctgtaaagta cgactaccac 3300 aagtacttca aagctgtctc tcctgagctc ttccatgtca ttgatgactt tgtgcagttt 3360 cagcttgaga agaatgaaat gcaaggaatg gattctgagc ttaggaggatc tgaggaggat 3420

gaagagaaag aagaggatat tgaagttcca aaggccatgg gggatatttt tgagtcgctt	3480		
gctggtgcca tttacatgga tagtgggatg tcactggaga cagtctggca ggtgtactat	3540		
cccatgatgc ggccactaat agaaaagttt tctgcaaatg taccccgttc ccctgtgcga	3600		
gaattgcttg aaatggaacc agaaactgcc aaatttagcc cggctgagag aacttacgac	3660		
gggaaggtca gagtcactgt ggaagtagta ggaaagggga aatttaaagg tgttggtcga	3720		
agttacagga ttgccaaatc tgcagcagca agaagagccc tccgaagcct caaagctaat	3780		
caacctcagg ttcccaatag ctaa	3804		
<210> 20 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial			
<220> <223> Synthetic primer rsGFP-F to amplify a gene encoding rsGFP			
<400> 20 gccacaacat tgaagatgga			
<210> 21 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial			
<220> <223> Synthetic primer rsGFP-R to amplify a gene encoding rsGFP			
<400> 21 gaaagggcag attgtgtgga			
<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial			
<220> <223> Synthetic primer Neo-F to amplify a gene encoding Neo			
<400> 22 atagcgttgg ctacccgtga	20		

20

42

42



<223>

<400>

26

GAGCGGATAA CATATGAGAG GAAAGGTTAA GTGG

34

ページ: 49/E

<210> 27

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

 $<\!223\!>$ Synthetic primer F to amplify a gene encoding CspB

<400> 27

GAGCGGATAA GGATCCTTAC TCAACTACTT TCACGTG

37



【書類名】要約書

【要約】

【課題】

特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質の提供、RNA干渉等に利用可能な特定の長さのdsRNAを効率よく生成させる方法並びにRNA合成の促進方法を提供すること。

【解決手段】

長鎖のdsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質の共存下でdsRNAにdsRNA分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さのdsRNAを効率よく調製できる方法及び当該核酸結合活性を有するタンパク質がdsRNA合成に代表されるRNA合成反応においてもその効率を向上させる方法。

【選択図】

なし



特願2004-086129

出願人履歴情報

識別番号

[302019245]

1. 変更年月日

2002年 4月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

氏 名 タカラバイオ株式会社